

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

JESSICA KARINA PONCHEKI

BETA-HIDROXIBUTIRATO E PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS DO LEITE BOVINO NO  
INÍCIO DA LACTAÇÃO: EFEITOS SOBRE PRODUÇÃO, REPRODUÇÃO E SANIDADE

CURITIBA  
2019

JESSICA KARINA PONCHEKI

BETA-HIDROXIBUTIRATO E PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS DO LEITE BOVINO NO  
INÍCIO DA LACTAÇÃO: EFEITOS SOBRE PRODUÇÃO, REPRODUÇÃO E SANIDADE

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, área de concentração Zootecnia – Nutrição e Produção de Herbívoros e Forragicultura, Departamento de Zootecnia, Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutor em Zootecnia.

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo de Almeida

Coorientador: Prof. Ph.D. Dante Pazzanese Duarte Lanna

CURITIBA

2019

P795b Poncheki, Jessica Karina  
Beta-hidroxibutirato e perfil de ácidos graxos do leite bovino no início da lactação: efeitos sobre produção, reprodução e sanidade / Jessica Karina Poncheki. - Curitiba, 2019.  
112 p.: il.,

Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Zootecnia.  
Orientador: Rodrigo De Almeida  
Coorientador: Dante Pazzanese Duarte Lanna

1. Vaca. 2. Leite - produção. 3. Leite - composição. 4. Leite - qualidade. I. Almeida, Rodrigo De (Orientador). II. Lanna, Dante Pazzanese Duarte (Coorientador). III. Título. IV. Universidade Federal do Paraná.

CDU 637.112



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
SETOR SETOR DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO ZOOTECNIA -  
40001016082P0

## TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em ZOOTECNIA da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da tese de Doutorado de **JESSICA KARINA PONCHEKI** intitulada: **Beta-hidroxibutirato e perfil de ácidos graxos do leite bovino no início da lactação: efeitos sobre produção, reprodução e sanidade**, após terem inquirido a aluna e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua **APROVAÇÃO** no rito de defesa.

A outorga do título de doutor está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 27 de Fevereiro de 2019.

RODRIGO DE ALMEIDA

Presidente da Banca Examinadora (UFPR)

MARINA DE ARRUDA CAMARGO DANÉS

Avaliador Externo (UFLA)

MAITY ZOPOLLATTO

Avaliador Interno (UFPR)

GERALDO TADEU DOS SANTOS

Avaliador Externo (UEM)

Ao Eduardo, amor da minha vida.

Dedico.

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por todas as oportunidades, por me dar forças e sabedoria para sempre seguir adiante.

Ao meu esposo Eduardo, que sempre me instigou a buscar o meu melhor. Obrigada pelos risos, discussões, decisões tomadas em conjunto. Obrigada por caminhar ao meu lado.

Agradeço meus pais, Rosa e Luciano, por me darem a vida e por fazerem tudo para que eu tivesse uma boa educação. “A maior herança que eu posso te deixar é o seu conhecimento, adquirido através do estudo” (palavras da minha mãe, Rosa).

Agradeço minha irmã Thayz que, mesmo não sendo ligada a área de ciências agrárias, colaborou na realização das coletas experimentais e na organização dos dados. Também não posso esquecer minha irmã Kely, que sempre torceu e vibrou com cada conquista minha e me deu dois sobrinhos lindos (Giovani e Lucas), que tenho muito orgulho.

Ao meu orientador, Dr. Rodrigo de Almeida, pela dedicação e carinho com a bovinocultura leiteira, por ser um grande exemplo de profissional e de pessoa. Por todas as oportunidades que o senhor me possibilitou, apoiando sem medidas a execução deste projeto. Obrigada pela paciência e por acreditar no meu potencial.

Ao meu coorientador, Dr. Dante Pazzanese Duarte Lanna, que nos apoiou oferecendo seu conhecimento e seu laboratório para as análises de perfil de ácidos graxos realizadas nesta pesquisa. Pelo grande profissional e exemplo de dedicação. Agradeço aqui também toda a equipe do Laboratório de Nutrição e Crescimento Animal da ESALQ/USP de Piracicaba, em especial a Tuka (Maria Antônia) pela paciência em explicar e me deixar executar as análises dentro do laboratório.

A Professora Rosangela Locatelli Dittrich, que colaborou com o desenvolvimento desta pesquisa e também gentilmente disponibilizou seu laboratório para que as análises sanguíneas fossem realizadas e ao funcionário do laboratório Olair Beltrame, por toda a paciência e dedicação aos estudos conduzidos em parceria com o Grupo do Leite da UFPR.

Agradeço a Associação Paranaense de Criadores de Bovinos da Raça Holandesa, em especial a José Augusto Horst, que acredita e apoia as pesquisas conduzidas pelo Grupo do Leite da UFPR.

A toda equipe da Agropecuária Régia, que viraram meus amigos, em especial ao Marcos Epp que abriu as portas da sua propriedade para que a ciência pudesse encontrar alguns caminhos para as dúvidas persistentes.

Ao Grupo do Leite da UFPR, pelas informações compartilhadas, pelo convívio sempre amigável. Em especial a Priscila Mendes de Souza, que esteve em praticamente todas as coletas experimentais junto comigo, e demais colegas que colaboraram de alguma forma com o resultado final deste projeto.

Paula, Carolina e Elaine, minhas queridas amigas, obrigada por sempre me desejarem o melhor (desde 2005!). Mesmo distantes fisicamente, sinto o abraço de apoio de cada uma.

Agradeço ao Programa de Pós-graduação em Zootecnia, professores, funcionários e colegas de doutorado e/ou mestrado e também a CAPES e CNPq pelo incentivo à pesquisa brasileira, em forma de bolsa de estudos e verba liberada para a realização deste projeto através do Edital Universal.

Aos animais, em especial às minhas coleguinhas (como gosto de chamar as vacas), que se dedicam integralmente para que tenhamos alimentos de qualidade na nossa mesa.

Muito obrigada!!

“Não existe nada de completamente errado no mundo, mesmo um relógio parado consegue  
estar certo duas vezes por dia.”  
Paulo Coelho.



## RESUMO

Doenças no período de transição tem impacto econômico negativo, por isso análises e ferramentas de avaliação efetivas são fundamentais para o desenvolvimento da bovinocultura leiteira. O objetivo foi analisar incidência de cetose e perfil de ácidos graxos (AG) no início da lactação de vacas holandesas e correlacionar com produtividade, sanidade e reprodução. Foram avaliadas 694 vacas, paridas entre setembro de 2015 e agosto de 2016, numa fazenda comercial em Palmeira, Paraná. Amostras de sangue e leite foram coletadas entre 4 e 15 dias pós-parto para análise de perfil metabólico e composição do leite. O perfil de AG foi feito com 190 amostras (um terço de animais saudáveis e dois terços de cetóticos) por cromatografia gasosa. No dia 5 e dia 10 o  $\beta$ -hidroxibutirato (BHB) foi avaliado utilizando tiras reagentes. Animais eram cetóticos se  $\text{BHB} \geq 1,20 \text{ mmol/L}$  no dia 5 ou 10. Produção de leite, incidência de doenças e dados reprodutivos foram coletados através de software. Foram avaliadas produção acumulada e média diária nos primeiros 30 e 100 DEL. A sanidade foi avaliada como ocorrência de uma ou duas doenças e descarte ou morte até 60 dias. As variáveis reprodutivas foram dias para primeira inseminação artificial (D1IA), dias abertos (DA), número de inseminações para prenhez (NIP), taxa de prenhez na primeira inseminação (P1IA), taxa de prenhez aos 150 dias (P150d) e perda de prenhez na primeira inseminação (Per1IA). As análises estatísticas foram feitas com SAS ou MedCalc, para gerar médias e comparações, correlações, regressão logística e área abaixo da curva ROC. Correlações fracas foram observadas entre BHB e metabólitos sanguíneos. Classificando em animais saudáveis e cetóticos, não houve diferença na produtividade, mas quando criada uma categoria de BHB intermediário (entre 0,7 e 1,20 mmol/L), estas vacas produziram mais leite ( $P < 0,05$ ) que as demais. Animais com cetose clínica tiveram mais AST e bilirrubina direta que saudáveis, mas colesterol, triglicerídeos, VLDL e bilirrubina indireta não diferiram ( $P > 0,10$ ). Vacas cetóticas tiveram D1IA maior ( $P < 0,05$ ), mas as demais variáveis reprodutivas não diferiram. Uma tendência foi observada entre o BHB e a incidência de doenças e não houve efeito sobre o descarte ou morte até 60 dias. Três AG representaram mais de 71% da gordura: C18:1 *cis*-9 (27,5%), C16:0 (26,8%) e C18:0 (17,1%). Fortes correlações foram observadas entre BHB e C18:1 *cis*-9 (0,62 e 0,59 com BHB5 e BHB10, respectivamente). Vacas saudáveis tiveram mais C4:0 até C14:0 do que cetóticas e C13:0 foi o AG com maior AUC para identificar cetose (0,94). As relações C17:0/C15:0 e C16:1 *cis*-9/C15:0 foram associadas a baixa produção de leite. Vacas com C18:1 *cis*-9  $> 33,607 \text{ g/100g}$  tiveram mais chances de falha reprodutiva aos 150 dias. Perfil de AG não foi eficiente para identificar incidência de doenças, mas C15:0 e suas relações apresentaram  $\text{AUC} > 0,85$  para identificar descarte ou morte até 60 dias. Conclui-se que BHB não possui correlação com doenças no início da lactação, mas vacas mais produtivas apresentam BHB entre 0,70 e 1,20 mmol/L. A concentração de C18:1 *cis*-9, C13:0 e as relações entre C17:0 e C16:1 *cis*-9 com C15:0 no pós-parto imediato podem ser utilizados como indicativos para avaliação do desempenho subsequente.

Palavras-chave: ácido oleico, cetose, composição do leite, perfil metabólico, período de transição.

## ABSTRACT

Transition period diseases can negatively impact economic results, therefore is important to use effective tools to analyze this moment. The aim of this study was to evaluate the effects of BHB and fatty acids (FA) in early lactation on milk yield (MY), health and reproduction of dairy cows. Data from 694 Holstein cows, calved between September 2015 and August 2016 in a commercial dairy herd in Southern Brazil was used. Milk and blood samples between 4 and 15 DIM were collected to evaluate milk composition and metabolic profile. In day 5 and 10 after calving, BHB was also measured using ketone test strips and BCS was evaluated. Ketosis prevalence was determined if  $\text{BHB} \geq 1.20 \text{ mmol/L}$ . Fatty acids profile was analyzed by gas chromatography and 190 samples (one third of healthy and two third of ketotic cows) were used. Individual incidence diseases and milk production were recorded using production software, both cumulative MY and MY average in the first 30 or 100 DIM were evaluated. Reproductive outcomes were assessed using days to first insemination (D1AI), days open (DO), number of inseminations for pregnancy (TAI), pregnancy rate at first AI (P1AI), pregnancy rate at 150 DIM (P150D), and pregnancy loss after first insemination (PL1AI). In order to run statistical analysis, CORR, GLIMMIX, and LOGISTIC procedures from SAS software were used and ROC curve was estimated by MedCalc software. Small correlations between BHB and metabolic and productive variables were observed. There was no difference ( $P > 0.10$ ) in MY between cows with  $\text{BHB} \geq 1.20 \text{ mmol/L}$  or healthy cows, but cows with intermediate BHB (between 0.7 and 1.20 mmol/L) produce more milk ( $P > 0.05$ ) than very low BHB and ketotic cows. Animals with clinical ketosis ( $\text{BHB} \geq 2.90 \text{ mmol/L}$ ) had higher ( $P < 0.05$ ) AST and direct bilirubin than healthy cows, but cholesterol, triglycerides, VLDL and indirect bilirubin did not differ ( $P > 0.05$ ). Cows with  $\text{BHB} \geq 1.20 \text{ mmol/L}$  showed higher ( $P < 0.05$ ) D1AI than healthy cows, but others reproductive outcomes did not ( $P > 0.05$ ) differ. A tendency ( $P < 0.10$ ) was observed between BHB and incidence of one disease up to 60 DIM and there are no effect ( $P > 0.10$ ) of BHB in culling or death until 60 DIM. Three FA represented more than 71% of fat: *c9* C18:1 (27.5%), C16:0 (26.8%) and C18:0 (17.1%). The strongest correlation observed with BHB was *cis-9* C18:1. Healthy cows had more C4:0 to C14:0 than ketotic cows and C13:0 had higher AUC to identify ketosis (0.94). Some FA ratios (C17:0/C15:0, *cis-9* C16:1/C15:0) was associated to low productive performance. Cows with *cis-9* C18:1  $> 33.607 \text{ g/100g}$  had 13.4 more likelihood to have reproductive failure at 150 DIM than animals with lower values. Fatty acids did not identify diseases incidence efficiently and C15:0 (variations or ratios) showed  $\text{AUC} > 0.85$  to identify culling or death until 60 DIM. We concluded that BHB was not correlated with incidence disease in early lactation, but more productive cows need to undergo a slight NEB early lactation, showing BHB between 0.70 and 1.20 mmol/L. Some FA in post-partum can be used to evaluate subsequent animal performance.

Key-words: ketosis, metabolic profile, milk composition, oleic acid, transition period.

## LISTA DE FIGURAS

### CAPÍTULO I – CONSIDERAÇÕES GERAIS

Figura 1. Balanço energético no período de transição.....21

Figura 2. Etapas do metabolismo dos ácidos graxos não esterificados (AGNE) pela oxidação completa ou parcial.....27

### CAPÍTULO II – EFFECTS OF HIGH $\beta$ -HYDROXYBUTYRATE IN EARLY LACTATION COWS: PRODUCTION, REPRODUCTION AND HEALTH

Figure 1. Cumulative milk yield (A) or average milk yield (B) in the first 30 or 100 days in milk of healthy cows (HEA; BHB < 1.20 mmol/L), subclinical ketosis (SCK;  $1.20 \text{ mmol/L} \leq \text{BHB} < 2.90 \text{ mmol/L}$ ) and clinical ketosis cows (CK;  $\text{BHB} \geq 2.90 \text{ mmol/L}$ ).....76

Figure 2. Cumulative milk yield in first 30 (A) or 100 (B) days in milk and milk yield average in first 30 DIM (C) or first 100 DIM (D), according BHB class in day 5 (BHB D5) or day 10 (BHB D10) after calving.....77

Figure 3. Days to first insemination after calving (a), days open (b) and number of artificial inseminations for pregnancy (c), according ketosis prevalence in early lactation.....78

## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO I – CONSIDERAÇÕES GERAIS

TABELA 1 – VALORES DE REFERÊNCIA PARA DETERMINADOS ANALITOS EXAMINADOS NO SORO SANGUÍNEO DE BOVINOS.....	33
--	----

TABELA 2 – INCIDÊNCIA DE DESORDENS EM VACAS LEITEIRAS DE ACORDO COM O PERÍODO DE LACTAÇÃO.....	34
--	----

### CAPÍTULO II – EFFECTS OF HIGH $\beta$ -HYDROXYBUTYRATE IN EARLY LACTATION COWS: PRODUCTION, REPRODUCTION AND HEALTH

TABLE 1 – VARIABLES INCLUDED IN EXAMINATION OF RISK FACTORS FOR KETOSIS PREVALENCE IN EARLY LACTATION COWS.....	69
---	----

TABLE 2 – DESCRIPTIVE DATA (MEANS AND STANDARD DEVIATION) OF COWS INCLUDED IN THE STUDY, ACCORDING TO PARITY ORDER.....	70
---	----

TABLE 3 – PEARSON CORRELATIONS BETWEEN $\beta$ -HYDROXYBUTYRATE IN DAY 5 (BHB D5) OR DAY 10 (BHB D10) AND OTHER VARIABLES.....	71
--	----

TABLE 4 – LEAST SQUARE MEANS AND STANDARD ERRORS OF METABOLIC PROFILE, ACCORDING BHB (MMOL/L) CATEGORIES.....	72
---	----

TABLE 5 – FINAL LOGISTIC REGRESSION MODEL OF FACTORS ASSOCIATED WITH KETOSIS PREVALENCE (BLOOD BHB $\geq 1.20$ MMOL/L) IN EARLY LACTATION COWS IN A COMMERCIAL DAIRY HERD IN SOUTHERN BRAZIL.....	73
---	----

TABLE 6 – RISK OF $\beta$ -HYDROXYBUTYRATE (BHB) LEVELS AFFECT PREGNANCY AT FIRST ARTIFICIAL INSEMINATION AFTER CALVING, PREGNANCY AT 150 DAYS IN MILK (DIM) AND PREGNANCY LOSS AFTER FIRST ARTIFICIAL INSEMINATION.....	74
--	----

TABLE 7 – RISK OCCURRENCE OF ONE OR TWO DISEASES AND CULLING OR DEATH UP TO 60 DIM, ACCORDING TO KETOSIS INCIDENCE IN EARLY LACTATION.....	75
--	----

### CAPÍTULO III – MILK FATTY ACIDS PROFILE IN EARLY LACTATION AND ASSOCIATIONS WITH PRODUCTION, REPRODUCTION AND HEALTH

TABLE 1 – VARIABLES INCLUDED IN EXAMINATION OF RISK FACTORS IN PROC LOGISTIC TO PRODUCTIVE AND REPRODUCTIVE OUTCOMES.....	99
---	----

TABLE 2 – DESCRIPTIVE DATA (MEANS AND STANDARD DEVIATION) OF 190 COWS INCLUDED IN STUDY, ACCORDING TO PARITY ORDER.....	100
---	-----

TABLE 3 – MILK FATTY ACIDS PROFILE IN EARLY LACTATION, ACCORDING PARITY ORDER, IN G/100G OF FAT.....	101
--	-----

TABLE 4 – PEARSON CORRELATIONS BETWEEN MILK FATTY ACIDS (G/100G OF FAT) AND OTHERS VARIABLES IN EARLY LACTATION DAIRY COWS.....	105
---	-----

TABLE 5 – LEAST SQUARE MEANS ( $\pm$ SD) OF MILK FATTY ACIDS AND FATTY ACIDS RATIOS BETWEEN 4 AND 15 DIM OF HEALTHY, SUBCLINICAL OR CLINICAL KETOSIS DAIRY COWS.....	106
TABLE 6 – AREA UNDER THE ROC CURVE OF FATTY ACIDS (G/100G OF FAT) AND RATIOS TO IDENTIFY KETOSIS IN EARLY LACTATION.....	108
TABLE 7 – RISK FACTORS OF LOW CUMULATIVE MILK PRODUCTION IN FIRST 100 DIM (ADJUSTED ACCORDING PARITY ORDER), ACCORDING FATTY ACIDS CLASSES IN EARLY LACTATION COWS.....	109
TABLE 8 – RISK FACTORS OF LOW DAILY MILK PRODUCTION AVERAGE IN FIRST 100 DIM (ADJUSTED ACCORDING PARITY ORDER), ACCORDING FATTY ACIDS CLASSES IN EARLY LACTATION COWS.....	110
TABLE 9 – RISK FACTORS ASSOCIATE WITH REPRODUCTIVE FAILURE AT 150 DIM, ACCORDING FATTY ACIDS CLASSES IN EARLY LACTATION COWS.....	111
TABLE 10 – AREA UNDER THE ROC CURVE OF FATTY ACIDS (G/100G OF FAT) AND RATIOS TO IDENTIFY CULLING OR DEATH UNTIL 60 DIM.....	112

## LISTA DE ABREVIATURAS

a	- Anteiso
acetil-CoA	- Acetil coenzima A
AG	- Ácido graxo
AGCC	- Ácido graxo de cadeia curta
AGMI	- Ácido graxo monoinsaturado
AGNE	- Ácido graxo não-esterificado
AGPI	- Ácido graxo polinsaturado
AGS	- Ácido graxo saturado
ALB	- Albumin
ALT	- Alanina amino transferase
AST	- Aspartato amino transferase
ATP	- Adenosina tri-fosfato
AUC	- Area under the curve
BEN	- Balanço energético negativo
BHB	- $\beta$ -hidroxibutirato
BHB10	- $\beta$ -hydroxybutyrate at day 10
BHB5	- $\beta$ -hydroxybutyrate at day 5
Bil D	- Direct bilirubin
Bil I	- Indirect bilirubin
Bil T	- Total Bilirubin
BSC	- Body condition score
c	- Cis
CEUA	- Comitê de ética de uso de animais
CHOL	- Cholesterol
CK	- Clinical ketosis
CLA	- Conjugated linoleic acid
CMS	- Consumo de matéria seca
D10	- Day 10
D1AI	- Days to first insemination
D5	- Day 5
DEL	- Dias em leite
DIM	- Days in milk
dL	- Decilitro
DMI	- Dry matter intake
DO	- Days open
ECC	- Escore de condição corporal
FA	- Fat acid
FPR	- Fat to protein ratio
GGT	- Gama glutamil transferase
GH	- Hormônio de crescimento
HDL	- High density lipoprotein
HEA	- Healthy

HMG-CoA	- 3-hidroxi-3-methyl-glutaril-CoA
i	- iso
IGF	- Fator de crescimento semelhante à insulina
kg	- quilograma
L	- Litro
LCFA	- Long chain fatty acids
LDL	- Low density lipoprotein
MCFA	- Medium chain fatty acids
mEq	- miliequivalente
mg	- miligrama
mmol	- milimolar
MUFA	- Monounsaturated fatty acids
MY100d	- Cumulative milk yield in the first 100 days
MY30d	- Cumulative milk yield in the first 30 days
MYA100d	- Milk yield average in the first 100 DIM
MYA30d	- Milk yield average in the first 30 DIM
NEB	- Negative energy balance
NEFA	- Non-esterified fat acid
NRC	- National Research Council
P150D	- Pregnancy rate at 150 DIM
P1AI	- Pregnancy rate at first artificial insemination
PUFA	- Polyunsaturated fatty acids
ROC	- Receiver Operating Characteristic
SCFA	- Short chain fatty acids
SCK	- Subclinical ketosis
SD	- Standard Deviation
SFA	- Saturated fatty acids
t	- trans
TAI	- Number of insemination to pregnancy
TG	- Triglicerídeo
U	- Unidades
VLDL	- Very low density lipoprotein

## SUMÁRIO

<b>CAPÍTULO I – CONSIDERAÇÕES GERAIS .....</b>	<b>16</b>
<b>1. INTRODUÇÃO GERAL .....</b>	<b>16</b>
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>18</b>
2.1 Período de transição em vacas leiteiras .....	18
2.2 Balanço energético negativo.....	20
2.3 Perfil metabólico no pós-parto .....	25
2.4 Doenças de vacas leiteiras no periparto.....	32
2.5 Composição lipídica do leite bovino .....	36
2.6 Considerações finais.....	40
<b>3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>42</b>
<b>CAPÍTULO II – EFFECTS OF HIGH <math>\beta</math>-HYDROXYBUTYRATE IN EARLY LACTATION COWS: PRODUCTION, REPRODUCTION AND HEALTH .....</b>	<b>51</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>51</b>
<b>INTRODUCTION .....</b>	<b>53</b>
<b>MATERIAL AND METHODS .....</b>	<b>54</b>
<b>RESULTS AND DISCUSSION.....</b>	<b>57</b>
<b>CONCLUSION .....</b>	<b>63</b>
<b>REFERENCES .....</b>	<b>65</b>
<b>CAPÍTULO III – MILK FATTY ACIDS PROFILE IN EARLY LACTATION AND ASSOCIATIONS WITH PRODUCTION, REPRODUCTION AND HEALTH.....</b>	<b>79</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>80</b>
<b>INTRODUCTION .....</b>	<b>81</b>
<b>MATERIAL AND METHODS .....</b>	<b>83</b>
<b>RESULTS AND DISCUSSION.....</b>	<b>86</b>
<b>CONCLUSION .....</b>	<b>92</b>
<b>REFERENCES .....</b>	<b>94</b>



## CAPÍTULO I – CONSIDERAÇÕES GERAIS

### 1. INTRODUÇÃO GERAL

Apesar de ser o quinto maior produtor de leite o mundo, o Brasil ainda não consegue atender toda a exigência do mercado interno (REINCKE et al., 2018). A importação tende a suprir esse déficit, mas acaba tendo um impacto negativo no preço do leite para os produtores nacionais, particularmente no sul do país.

Para suprir a demanda interna e atingir o mercado exterior, cada vez mais a bovinocultura leiteira brasileira vem se tecnificando e evoluindo, aplicando mais ferramentas que auxiliam na tomada de decisão de forma mais rápida e segura. A intensificação da atividade é uma forma efetiva de melhorar produtividade e retorno financeiro (WITTWER, 2000). Porém, se os animais passam a produzir mais e não tem um manejo adequado, a chance de ocorrer doenças ou distúrbios metabólicos aumenta, prejudicando o desempenho animal ao longo da lactação (HAYIRLI et al., 2002; OETZEL, 2004).

Compreender as alterações metabólicas e os desafios do período de transição, tipicamente definido como as três semanas que precedem o parto e as três semanas após o parto, é considerado ponto chave para adequar as estratégias de manejo e obter sucesso durante toda a lactação (DRACKLEY, 1999). Pelo fato de ocorrerem diversas alterações anatômicas, fisiológicas, hormonais e metabólicas, esse é o período de maior preocupação nutricional e de maior manifestação de distúrbios metabólicos e infecciosos no ciclo produtivo de uma vaca leiteira (DUBUC et al., 2010).

Uma doença que vem sendo identificada com altos índices de incidência nos rebanhos leiteiros do mundo todo é a cetose subclínica (ABDELI et al., 2017). Esta doença, mais comum durante o pós-parto imediato, é caracterizada pelo aumento na concentração de corpos cetônicos na corrente sanguínea, principalmente relacionado ao  $\beta$ -hidroxibutirato (BHB). Duffield et al. (1998) definiram como cetose subclínica animais que apresentavam  $BHB \geq 1,20$  mmol/L e inúmeros trabalhos vêm correlacionando este valor com incidências de outras doenças, queda na produção de leite e piora no desempenho reprodutivo (MCART et al., 2013; SUTHAR et al., 2013).

Buscando aperfeiçoar a identificação das doenças e realizar menos intervenções nos animais, a composição do leite vem sendo utilizada de maneira mais aprofundada. O perfil de ácidos graxos do leite é uma ferramenta promissora para auxiliar na identificação de animais com problemas relacionados ao balanço energético negativo no início da lactação. Dórea et al. (2017) concluíram que é possível correlacionar determinados ácidos graxos do leite com a concentração de ácidos graxos não esterificados (AGNE) na circulação de vacas no pós-parto. Não tão somente ácidos graxos do leite, mas também algumas relações entre esses ácidos graxos, como a relação C18:1/C15:0 e C17:0/C15:0.

Objetivou-se com esse estudo avaliar o efeito do aumento da concentração de BHB no início da lactação sobre a produtividade, desempenho reprodutivo e sanidade de vacas leiteiras de alta produção, assim como identificar possíveis ácidos graxos e suas relações que auxiliem na identificação de animais ou rebanhos com problemas associados ao balanço energético negativo.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Período de transição em vacas leiteiras

O período de transição, classicamente definido como as três semanas que antecedem o parto até três semanas após o parto (GRUMMER, 1995), vem sendo destaque de inúmeras pesquisas científicas desde o artigo escrito por Drackley (1999). Neste trabalho, o autor destaca que a compreensão das alterações que ocorrem no organismo de uma vaca leiteira ao redor do parto é fator decisivo para adaptarmos as melhores estratégias de manejo para ter sucesso nesta fase e consequentemente em toda a lactação.

Para preparar a vaca para o parto e início da lactação, o período de transição é caracterizado por grandes alterações endócrinas e metabólicas, que compreendem ainda mudanças fisiológicas e até mesmo anatômicas (HAYIRLI et al., 2002; HUZZEY et al., 2007). Grandes variações hormonais, mudanças de rotas metabólicas e a expulsão do feto são algumas alterações que ocorrem rapidamente no organismo do animal no periparto. Essas mudanças naturalmente causam um estresse imunológico no animal, que se agrava com a mudança dietética e ambiental e o próprio esforço associado ao parto (MULLIGAN e DOHERTY, 2008). Portanto, existe um maior risco de doenças e descartes involuntários no período logo após o parto. Pinedo et al. (2014) observaram que o risco de descarte devido a doenças foi maior no início da lactação (até 60 DEL) do que no final da lactação.

A grande demanda de glicose, pelo feto e depois para a lactogênese, exige que o organismo utilize vários mecanismos de estimulação da gliconeogênese e direcionamento da glicose para os tecidos mais importantes. Em revisão de Wankhade et al. (2017), os autores destacaram que o hormônio do crescimento (GH) tem um aumento no início da lactação, justamente para estimular a produção de glicose no fígado. Estes mesmos autores reforçam que o GH causa uma resistência à insulina, principalmente nos tecidos periféricos, fazendo com que a glicose seja prioritariamente direcionada para a glândula mamária. Os demais tecidos como fígado e músculos podem fazer uso de outras fontes de energia, que pode ser suprida através da lipomobilização.

Uma importante alteração no metabolismo durante o período de transição é da insulina. A insulina está diretamente relacionada à regulação da glicemia e seus níveis diminuem no final da gestação, apresentam um pico durante o parto e cai em sequência (KUNZ; RUDE, 1985). Enquanto a concentração de insulina estiver baixa na circulação, haverá uma sinalização para que a glicose seja poupada e a energia precisa ser suprida por outras fontes, como a mobilização do tecido adiposo ou utilização de aminoácidos para entrarem em via gliconeogênica (RABELO; CAMPOS, 2009).

Ainda no dia do parto, glucagon e glicocorticoides também têm um pico e auxiliam no estímulo à lipomobilização e uso do glicogênio hepático, resultando num pico de glicose na circulação, que cai imediatamente em seguida (EDGERTON; HAFS, 1973; GRUMMER, 1995; RASTANI et al., 2007). A tiroxina aumenta durante a gestação e cai até 50% no final da gestação, normalizando os valores após o parto (PETHES et al., 1985). A progesterona começa a cair nos últimos 20 dias que precedem o parto, mas a queda mais acentuada é observada 2 a 3 dias antes do parto. Já o estrógeno tem um incremento no final da gestação e voltam a níveis normais logo após a parição (PAPE-ZAMBITO et al., 2007).

A queda da imunocompetência e o maior risco de surgimento de doenças durante o período de transição estão relacionados às alterações hormonais, bem como a falta de glicose e a lipomobilização (ESPOSITO et al., 2014). A ocorrência de distúrbios patológicos compromete o desempenho reprodutivo e produtivo no período subsequente, aumentando assim o risco de descarte desses animais (ALMEIDA et al., 2012).

Outro fator determinante é a acentuada redução de consumo de matéria seca (CMS) durante o periparto (NRC, 2001). No final da gestação, o feto ocupa grande parte da cavidade abdominal, limitando a capacidade de ingestão de alimentos. De acordo com Grummer e Rastani (2004), há redução de aproximadamente 30% no consumo alimentar nas últimas três semanas de gestação. Esta drástica queda no CMS é ainda mais intensa em vacas com elevado escore de condição corporal (ECC) (GRUMMER, 1995). Outros fatores podem agravar a queda do CMS, como agrupamento de primíparas e múltiparas juntas, sobrepopulação nos lotes pré e pós-parto entre outros. Durante o período seco e pré-parto, é interessante separar animais de primeira cria dos demais, pois assim é possível direcionar melhor o manejo nutricional e diminuir as disputas sociais que acabam por afetar ainda mais a depressão na ingestão. Embora esta separação seja desejável, sua implantação em rebanhos comerciais é pouco usual e acaba sendo incorporada apenas em grandes rebanhos.

A formação final do feto e a produção de colostro acabam drenando uma grande quantidade de cálcio que associado ao desbalanço no CMS resulta em baixos níveis circulantes desse mineral. A hipocalcemia tem correlação com menor motilidade ruminal e consequente redução no consumo, queda na produtividade e maior suscetibilidade a outras doenças metabólicas e infecciosas, principalmente em vacas multíparas de alta produção (MARTINEZ et al., 2012; CHAMBERLIN et al., 2013). O valor para normocalcemia é bastante discutido entre diferentes grupos de estudo, mas trabalhos mais recentes vêm indicando que problemas como metrite ocorrem em vacas com concentração de cálcio abaixo de 8,6 mg/dL (MARTINEZ et al., 2012). Atualmente este valor tem sido usado como referência para diagnosticar animais com hipocalcemia. Assim, o monitoramento da concentração sérica de Ca total torna-se importante na primeira semana da lactação (DUFFIELD; LEBLANC, 2009).

Buscando minimizar os efeitos das alterações metabólicas durante o período de transição, algumas alternativas têm sido sugeridas, como aumentar a densidade de nutrientes na dieta nos últimos 21 dias antes do parto, utilizar dietas aniônicas, proporcionar conforto ambiental para minimizar a diminuição do apetite e incluir aditivos na dieta no pré e pós-parto (NRC, 2001). Nesse momento, o manejo nutricional deve atender adequadamente as exigências nutricionais e proporcionar uma adaptação segura em relação à transição, para que os efeitos negativos sejam minimizados, culminando numa menor incidência de doenças e melhor desempenho produtivo e reprodutivo (LEFEBVRE, 2008; SANTOS et al. 2010).

## 2.2 Balanço energético negativo

Cerca de 3 a 4 semanas antes do parto, os nutrientes presentes na circulação são direcionados para a glândula mamária de maneira mais intensa, para a formação do colostro e leite. A síntese de leite aumenta rapidamente nos primeiros dias pós-parto e demanda uma grande quantidade de energia e proteína. Porém, a queda no CMS, que já se inicia 2-3 semanas pré-parto e se agrava no dia do parto, não sustenta a produção de leite por si só (KRAMER et al., 2009). Em vacas saudáveis, o CMS até aumenta nos dias seguintes ao parto, mas não na mesma proporção que a produção de leite aumenta neste período. Assim, a mobilização das reservas corporais constitui uma alternativa para fornecer os nutrientes necessários para a produção de leite durante as primeiras semanas da lactação (JUCHEM et al., 2004). Esse

desencontro entre alta demanda e baixo consumo de energia é chamado de balanço energético negativo (BEN) (Figura 1).

É um consenso entre os pesquisadores que o BEN é uma condição fisiológica para vacas leiteiras no início da lactação, ainda mais para aquelas mais produtivas. Porém, os casos que o BEN é muito intenso ou muito longo são considerados eventos extremos e prejudiciais aos animais (CECILIANI et al., 2018). Em estudo com vacas holandesas em free-stall, Poncheki et al. (2015) observaram que o tempo para atingir o peso mínimo após o parto foi de entre 32 e 37 dias após o parto, mas esse período de BEN certamente varia entre rebanhos e até mesmo entre animais. Quanto mais rápido e menos intenso for esse período, maiores são as chances de uma lactação saudável.

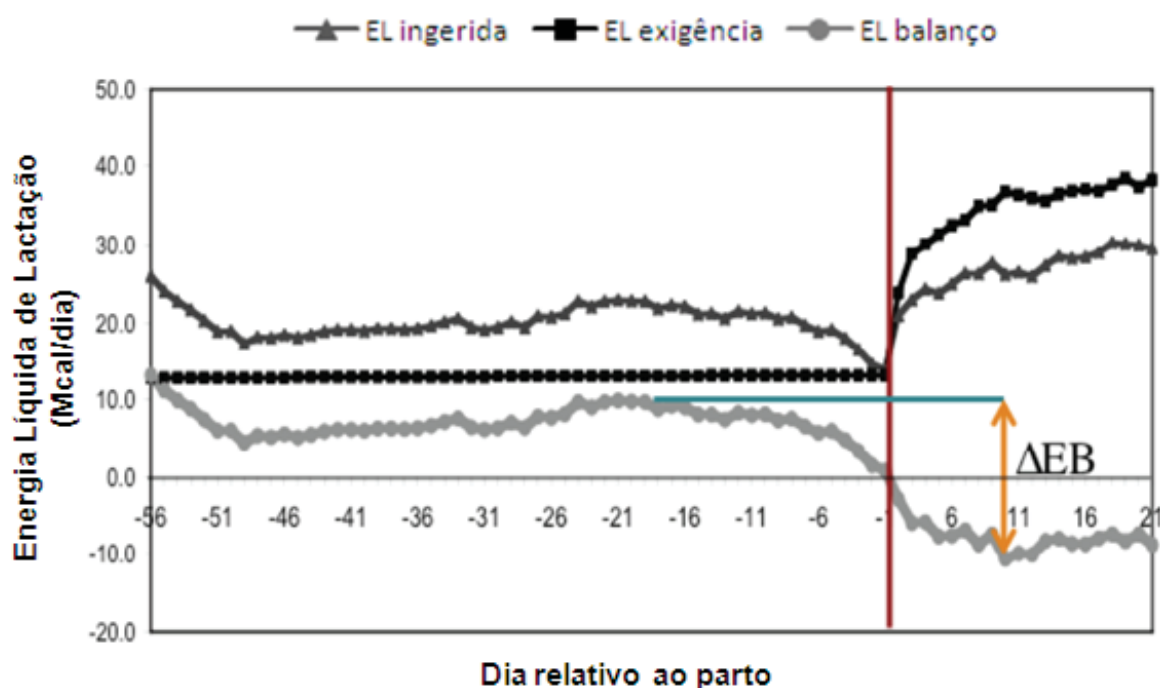


Figura 1. Balanço energético no período de transição.  
FONTE: GRUMMER (2009).

A glicose é o nutriente primário responsável pela quantidade de leite produzida, já que é utilizada para a síntese de lactose e, consequentemente, na própria produção de leite. Em animais de alta produção, cerca de 80% da glicose circulante é destinada à síntese de leite (LAGO et al., 2004). No início da lactação, vários mecanismos se ativam para que a glicose seja utilizada apenas pelos tecidos que não conseguem aproveitar outras fontes de energia e um

sistema de partição de energia direciona a glicose para a síntese de leite. De acordo com Reynolds et al. (2003), a necessidade energética que é de aproximadamente 1 kg de glicose/dia no final da lactação, aumenta para 2,5 kg/dia durante as primeiras três semanas pós-parto. Por esse fator e pelas características alimentares nesse período, é muito difícil atender toda a necessidade de energia através da dieta (FUCK et al., 2000).

O ácido graxo de cadeia curta (AGCC) propionato, principal precursor de glicose nos ruminantes, é produzido em menor quantidade quando o animal consome menos alimento (FERNANDES et al., 2012), consequentemente há pouca glicose circulante. É uma característica comum no início da lactação que as vacas sejam hipoglicêmicas, o que não é completamente ruim, pois nesses casos insulina e IGF-1 estão baixos e o GH continua sendo produzido (WANKHADE et al., 2017). O nível de insulina é diretamente proporcional à glicemia, portanto nesse momento ela também estará reduzida. Baixa insulina circulante indica ao organismo que está faltando energia, estimulando a mobilização de reservas corporais. Assim, as mudanças nas concentrações hormonais no periparto associada à queda dos níveis de insulina e glicose promovem a mobilização do tecido adiposo e a liberação de ácidos graxos livres e glicerol (POGLIANI et al., 2010).

Quando esta mobilização de reservas ocorre de forma controlada e por curto período de tempo, o animal passa pelo BEN sem complicações (JORRISTMA et al., 2003), mas se o BEN é muito intenso e prolongado podem ocorrer múltiplos problemas, incluindo casos clínicos, perda de produtividade e uma tendência a menor fertilidade (DUFFIELD et al., 2009).

O tecido adiposo é composto em grande parte por triglicerídeos (TG) e a lipase sensível a hormônio que atua nesse tecido durante períodos de BEN origina AGNE (SANTOS; SANTOS, 1998). Os AGNE podem ser utilizados de diferentes maneiras; sem necessariamente passar pelo fígado, eles podem gerar energia para tecidos periféricos ou até mesmo serem direcionados à glândula mamária, onde serão utilizados para compor a gordura do leite. Também podem chegar ao fígado, onde serão metabolizados por diferentes vias.

Dentro do fígado existem três vias de utilização dos AGNE que acontecem concomitantemente; uma delas, que infelizmente é rapidamente saturada, é a  $\beta$ -oxidação completa, que tem como produto final ATP que será utilizado principalmente pelo próprio tecido hepático. Outra via metabólica é a reesterificação dos AGNE em TG. Para sair do fígado e ir ao tecido alvo, como tecidos periféricos e glândula mamária, o TG liga-se ao VLDL, uma lipoproteína de transporte. Quando a  $\beta$ -oxidação completa fica limitada pela falta de

oxaloacetato (que é utilizado para a gliconeogênese), a acetil coenzima A (acetil-CoA) é desviada do ciclo do ácido cítrico e para a síntese de corpos cetônicos ou cetogênese, rota conhecida como  $\beta$ -oxidação parcial, gerando como produtos finais os corpos cetônicos, entre eles o BHB (HUTJENS; AALSETH, 2005). O BHB pode ser utilizado como fonte de energia pelos tecidos periféricos, suprimindo parte da demanda de energia.

Quando o BEN é muito acentuado e a mobilização do tecido adiposo é exacerbada, ocorrem problemas relacionados ao metabolismo dos produtos gerados. Os TG gerados no fígado só saem para a circulação se ligados ao VLDL; o fígado tem capacidade limitada de produzir esta lipoproteína, portanto o excesso de TG não tem como ser exportado (SEJERSEN et al., 2012). Nesta situação ocorre o acúmulo de TG nos hepatócitos e a função dessas células fica comprometida. Este quadro é chamado de esteatose hepática ou fígado gorduroso. Um segundo agravante quando a lipomobilização é muito intensa é o acúmulo de corpos cetônicos. Os corpos cetônicos não são utilizados por todos os tecidos corporais e mesmo aqueles que geram energia através deles não conseguem metabolizar a grande quantidade produzida. Neste caso tem-se um acúmulo desses metabólitos, gerando um quadro de cetose clínica ou subclínica, de acordo com a quantidade de corpos cetônicos acumulados e os sinais clínicos apresentados (DUFFIELD; BAGG, 2002).

Os principais metabólitos utilizados para a avaliação da intensidade do BEN são o AGNE e BHB. Chung et al. (2008) afirmaram que as concentrações séricas destes dois metabólitos são a melhor maneira de avaliar o status nutricional e a adaptação ao BEN de vacas leiteiras durante o período periparto.

A caracterização inicial de um quadro de má adaptação ou intenso BEN é o acúmulo de AGNE e BHB na corrente sanguínea e acúmulo de TG nos hepatócitos. Altas concentrações séricas de AGNE e BHB têm efeito prejudicial à saúde e produtividade de vacas leiteiras devido a relação entre deficiência energética e imunossupressão, contribuindo para a ocorrência de diversas doenças no pós-parto, como a hipocalcemia, cetose, retenção de placenta, metrite e deslocamento de abomaso (GRUMMER, 1995; GOFF; HORST, 1996; DRACKLEY, 1999; CHUNG et al., 2008; OSPINA et al., 2010a).

Em vacas saudáveis, a concentração plasmática dos AGNE aumenta a partir dos quinze últimos dias que antecedem o parto, alcançando o pico no primeiro dia pós-parto, reduzindo sua concentração nos dias seguintes devido ao aumento do CMS (LEBLANC et al., 2005). Já



o BHB, por ser um produto do metabolismo do AGNE, tem seu pico após o pico de AGNE, tipicamente na segunda semana pós-parto.

OSPINA et al. (2010b) correlacionaram os efeitos de elevadas concentrações séricas de AGNE e BHB no pós-parto com a produção leiteira em 305 dias e com o desempenho reprodutivo. Vacas multíparas produziram 647 kg de leite a menos quando  $\text{AGNE} > 0,72 \text{ mEq/L}$ , e 393 kg a menos quando  $\text{BHB} > 10 \text{ mg/dL}$ , demonstrando o efeito negativo destes metabólitos sobre a produção. No entanto, esse efeito não foi observado na categoria de vacas de primeira cria. Primíparas produziram 488 kg de leite a mais quando apresentaram níveis séricos de AGNE acima do valor crítico, sendo da mesma forma com o BHB, em que produziram 403 kg a mais quando acima do valor crítico. Com relação ao desempenho reprodutivo, tanto vacas como novilhas obtiveram menores taxas de prenhez quando AGNE e BHB estiveram acima do nível crítico, tendo uma diminuição média de 14,5% na taxa de prenhez.

Em uma meta-análise realizada por Abdeli et al. (2017), os resultados indicaram que altos níveis de AGNE e BHB no periparto tem efeito negativo na taxa de prenhez na primeira inseminação. Neste mesmo estudo também ficou evidenciado que altos níveis de AGNE e BHB prejudicam o desenvolvimento e as funções das células de defesa (neutrófilos e leucócitos), diminuindo a eficiência de atuação contra os processos infecciosos e inflamatórios, aumentando o risco de metrite puerperal, por exemplo.

Mais recentemente, Ramires et al. (2014) observaram que concentrações séricas de BHB demasiadamente baixas, inferiores a  $0,6\text{-}0,8 \text{ mmol/L}$ , não são necessariamente desejáveis, pois tipicamente estas vacas apresentam produções de leite mais baixas. Embora os autores corroborem que concentrações altas de BHB são indesejáveis, eles sugerem que vacas que apresentem concentrações de BHB intermediárias no pós-parto, entre  $0,8 \text{ e } 1,2 \text{ mmol/L}$ , apresentarão lactações mais produtivas.

De maneira intrigante, o trabalho de Bicalho et al. (2017) não encontrou diferença entre os níveis de AGNE e BHB para vacas que apresentaram retenção de placenta, metrite ou endometrite. Neste trabalho, a glicose foi o metabólito que variou entre os animais sadios e aqueles que apresentaram alguma doença, porém os autores não souberam explicar com clareza qual seria a atuação da glicose nessas situações.

Dessa forma, ainda há necessidade de mais trabalhos que identifiquem a maneira de atuação do AGNE e BHB durante o período de BEN, para que haja uma maior clareza dos efeitos desses metabólitos sobre a produção, sanidade e reprodução de vacas leiteiras no início da lactação.

### 2.3 Perfil metabólico no pós-parto

Uma maneira de avaliar a homeostase e seus desequilíbrios é através da avaliação do perfil metabólico dos animais. O perfil metabólico é um conjunto de exames sanguíneos, visando quantificar a concentração de metabólitos específicos com o objetivo de diagnosticar, avaliar e até mesmo prevenir transtornos metabólicos (PAYNE, 1970). A análise do perfil metabólico permite o diagnóstico de alterações no metabolismo e deficiências nutricionais, assim como pode ser utilizado como preventivo de desordens latentes e da pesquisa de problemas de saúde ou no desempenho produtivo de um rebanho (LEBLANC et al., 2006; DUFFIELD & LEBLANC, 2009).

Vários trabalhos já foram desenvolvidos buscando caracterizar o perfil metabólico de vacas durante o período de transição, avaliando analitos relacionados ao metabolismo energético, às funções de órgãos fundamentais como o fígado ou até mesmo às funções imunológicas dos animais (KAYANO e KIDA, 2015; ZACHUT et al., 2018; LUKE et al., 2019). Esses exames são fundamentais para a identificação de desordens subclínicas que, como o próprio nome sugere, não apresentam sinais clínicos visíveis. Além de que estes exames podem ser feitos precocemente, antecipando efeitos deletérios da evolução de doenças subclínicas para quadros clínicos (PRODANOVIĆ et al., 2012).

Um entrave para o uso do perfil metabólico de maneira rotineira na propriedade é a falta de praticidade nas análises, já que estas necessitam de um laboratório apropriado que nem sempre está acessível ao produtor. Para estas análises ainda é necessário kits reagentes e analisadores bioquímicos automáticos, que acabam encarecendo esta prática. Alguns trabalhos vêm sugerindo a utilização de análises através de espectroscopia infravermelha, o que poderia tornar as análises bioquímicas mais acessíveis (CALAMARI et al., 2016).

Para determinar quais metabólitos serão avaliados, é importante identificar as principais vias metabólicas e seus produtos que estão relacionados ao tema de estudo. Durante o período de transição, os principais acontecimentos estão relacionados ao metabolismo energético. Para esta caracterização, avaliam-se concentrações de glicose, colesterol, TG, AGNE e BHB. Como já mencionado anteriormente, as concentrações de AGNE e BHB são consideradas as melhores ferramentas para avaliar a intensidade do BEN (CHUNG et al., 2008).

Os AGNE são ácidos graxos livres liberados a partir da quebra do tecido adiposo, sendo utilizados para suprir parte da energia deficitária durante o BEN (BRICKNER et al., 2007). Como a glicose está sendo poupada e direcionada principalmente para a glândula mamária, uma fonte de energia alternativa para os demais tecidos precisa ser disponibilizada. O tecido muscular esquelético é capaz de utilizar AGNE para gerar energia para sua manutenção, por isso a quebra dos TG do tecido adiposo é uma das primeiras respostas frente ao BEN (OVERTON; WALDRON, 2004). Estes mesmos autores afirmaram que a concentração de AGNE na circulação animal é proporcional à necessidade de energia, além de estar diretamente associada ao inadequado CMS.

Mesmo em vacas sadias, o AGNE aumenta a partir de 15 dias antes do parto e seu pico ocorre no dia do parto ou no dia seguinte, caindo gradativamente conforme aumento no CMS (LEBLANC et al., 2005). Portanto, o melhor período para avaliar a concentração de AGNE é entre 14 dias antes do parto até 14 dias após o parto, sendo que o dia do parto é o momento mais indicado. Valores de referência foram sugeridos por Ospina et al. (2010b); para animais no pré-parto, AGNE deve ser menor que 0,29 mEq/L e no pós-parto o nível crítico fica em 0,57 mEq/L.

É importante lembrar que outros fatores podem afetar a concentração de AGNE sanguíneo, relacionados tanto ao metabolismo do animal quanto ao armazenamento da amostra. Qualquer fator que possa comprometer o CMS pode levar a um quadro de lipomobilização e alterar a concentração de AGNE. Condições inadequadas ou demasiado tempo de armazenamento podem comprometer a qualidade da amostra. Na prática, não é uma análise realizada corriqueiramente, pois seu custo é elevado e dependente de laboratório de análises clínicas.

Um segundo analito que auxilia na compreensão do metabolismo energético é o BHB, um dos corpos cetônicos produzidos na  $\beta$ -oxidação parcial. Por ser um produto sintetizado também a partir dos AGCC provenientes do rúmen, é comum detectar a presença de BHB em

animais ruminantes. O BHB é o corpo cetônico sintetizado em maior quantidade e em quadros de cetose, acetoacetato e cetona também estarão elevados (FERNANDES et al., 2012).

Durante o BEN do início da lactação, a  $\beta$ -oxidação do AGNE só é completa se há disponibilidade de oxaloacetato. A molécula de acetil-CoA que é gerada na oxidação do AGNE entra no ciclo do ácido cítrico ligada ao oxaloacetato. Neste momento, existe um maior estímulo da via de gliconeogênese e o oxaloacetato, que é substrato desta via, é utilizado com prioridade para sintetizar glicose. Dessa forma, a entrada da acetil-CoA no ciclo de Krebs fica comprometida e há um acúmulo de acetoacetil-CoA (molécula anterior ao acetil-CoA na via de  $\beta$ -oxidação). Maior concentração desta molécula estimula enzima HMG-CoA sintase que desvia o acetoacetil-CoA para a rota de síntese de corpos cetônicos, onde serão sintetizados acetoacetato, acetona e BHB (Figura 2). Os corpos cetônicos podem ser utilizados como fonte de energia; assim a concentração de BHB no sangue é resultado da quantidade sintetizada menos aquilo que foi utilizado para gerar ATP (NELSON e COX, 2014).

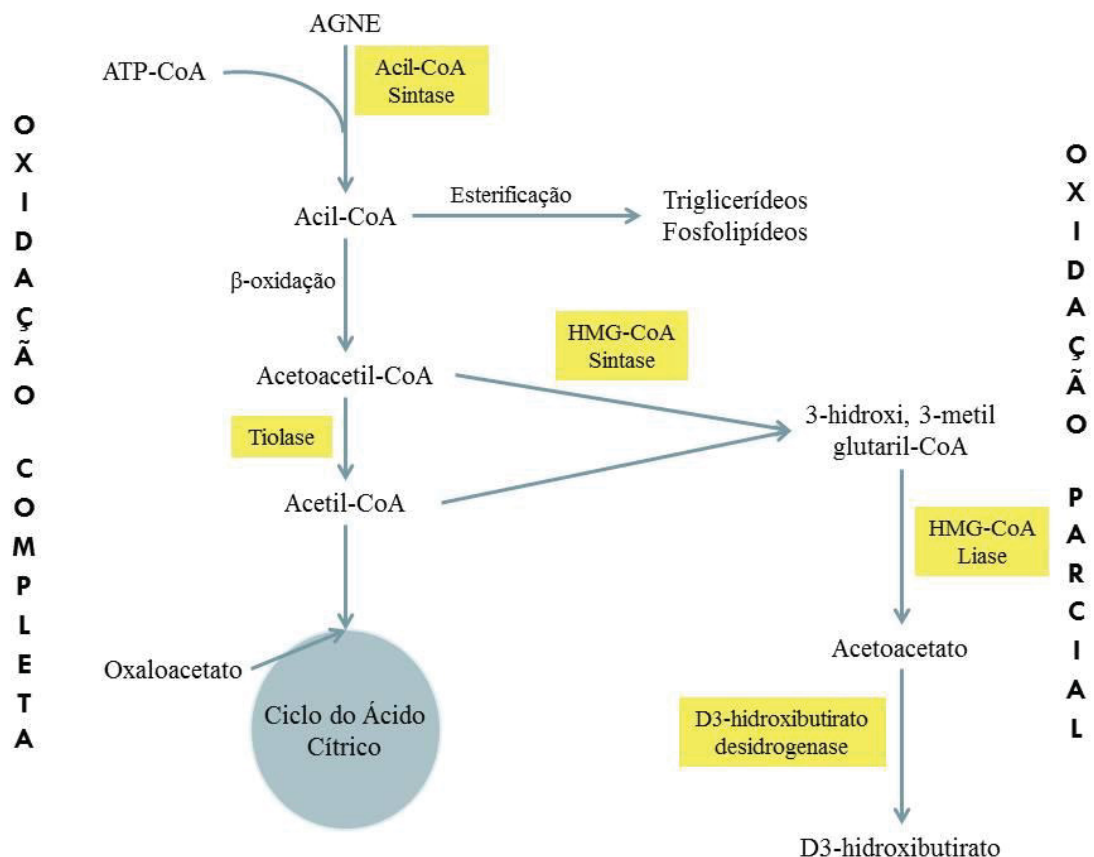


Figura 2. Etapas do metabolismo dos ácidos graxos não esterificados (AGNE) pela oxidação completa ou parcial.

FONTE: Adaptado de Nelson e Cox (2014).

Como o BHB é resultado do metabolismo do AGNE, o momento adequado para fazer a avaliação de BHB é nos primeiros dias após o parto, já que o pico de AGNE é justamente no dia do parto. Os protocolos de mensuração podem variar, mas é aconselhável realizar pelo menos duas medições entre o 5º e o 10º dia pós-parto, para identificar com mais precisão a incidência real de cetose no rebanho. Se uma terceira medição puder ser realizada, parece que uma coleta entre o 10º e o 15º dia pós-parto seria aconselhável. Para cetose subclínica considera-se valores de BHB  $\geq 1,20$  mmol/L e cetose clínica BHB  $\geq 2,90$  mmol/L associado com queda de CMS e queda na produção de leite (OSPINA et al., 2010b).

A avaliação de BHB tem sido aplicada corriqueiramente nas propriedades leiteiras mais especializadas. Além de ser possível avaliar de diferentes formas (urina, sangue, leite), existem testes práticos que podem ser realizados “ao pé da vaca” com o resultado em poucos segundos, como é o caso das tiras reagentes para corpos cetônicos que são utilizadas em glicosímetros portáteis.

Barletta et al. (2017) avaliaram a variação do ECC (de acordo com a metodologia proposta por Wildeman et al., 1982) durante o período de transição (-21 dias até +21 dias em relação ao parto) e observaram que as vacas que perderam ECC nesse período apresentaram maiores valores de BHB no pós-parto, indicando que o BHB pode refletir a intensidade do BEN. Djoković et al. (2014) observaram que as vacas que apresentaram cetose no pós-parto tiveram níveis menores de colesterol, triglicerídeos e glicose do que as vacas sadias. Vacas com cetose clínica ou subclínica apresentam também maiores níveis de estresse oxidativo, comprometendo a resposta antioxidante e podendo causar morte celular (LI et al., 2016).

Apesar de algumas variações nos valores de referência, altos níveis de BHB estão associados com diversas doenças no pós-parto, como retenção de placenta, metrite e deslocamento de abomaso (GOFF e HORST, 1996; DRACKLEY, 1999; OSPINA et al., 2010a; SEIFI et al., 2011)

O colesterol é outra molécula relacionada ao metabolismo energético. É essencial para o organismo, já que compõe as membranas celulares, é precursor da vitamina D, de hormônios esteroides e também utilizado para formação dos sais biliares. É sintetizado principalmente no fígado, gônadas e intestino a partir da acetil-CoA (KANEKO, 2008). Ainda não está completamente compreendida a modificação do metabolismo do colesterol durante o período

de transição, mas sabe-se que a síntese de colesterol aumenta para suprir a demanda de produção de VLDL e sais biliares, assim como auxiliar na formação e manutenção das membranas das células do fígado (SCHLEGEL et al., 2012).

Em trabalho conduzido por Schlegel et al. (2012) foi observado que o nível de colesterol no fígado tem uma menor concentração três semanas antes do parto e a máxima concentração foi observada uma semana após o parto, caindo gradualmente nas semanas seguintes. O inverso foi observado em relação à concentração de colesterol no plasma, a menor concentração foi observada na primeira semana pós-parto, aumentando de maneira gradual e atingindo a concentração máxima 14 semanas pós-parto. Estes autores afirmaram que o início da lactação é marcado por uma maior expressão dos genes relacionados à síntese de colesterol e a captura do sangue através do LDL.

Ruprechter et al. (2018) concluíram que tanto o colesterol quanto a albumina podem ser usados como preditores de casos de retenção de placenta, metrite e mastite em vacas multíparas. Estes autores sugeriram ainda que vacas com colesterol menor ou igual a 1,7 mmol/L na semana do parto têm maiores chances de desenvolver mastite.

As lipoproteínas têm importante papel no metabolismo energético, são elas que realizam o transporte dos lipídeos pela circulação corporal e são classificadas de acordo com a sua densidade (KANEKO et al., 2008). Os lipídeos da dieta são absorvidos inicialmente na forma de micelas e já nas células intestinais grande parte dos lipídeos é encapsulada em lipoproteínas de baixa densidade, chamadas de quilomícrons. Podem ser direcionados aos tecidos sem necessariamente passar pelo fígado. Colesterol e triglicerídeos são liberados dos hepatócitos para a circulação apenas se ligados a VLDL (KESSLER et al., 2014). A principal função do VLDL é distribuir os triglicerídeos para os tecidos (BRUSS, 2008).

Karimian et al. (2015) notaram que vacas suplementadas com maiores doses de gordura no pré-parto apresentaram valores maiores de VLDL no pós-parto e relataram que uma maior concentração de VLDL poderia aumentar a exportação de TG do fígado e diminuir os riscos de cetose e fígado gorduroso. Em estudo conduzido por Imhasly et al. (2015) foi constatado um decréscimo na concentração de fosfatidilcolina durante o período de transição, com menor concentração na primeira semana após o parto. Os autores correlacionaram esses resultados com a queda nos níveis de VLDL e maior probabilidade de acúmulo de TG no fígado.

Jia et al. (2019) observaram que vacas com fígado gorduroso apresentaram menores valores de VLDL quando comparadas com vacas saudáveis. Estes autores concluíram que os AGNE promovem a síntese de perilipina, que estimula a produção de lipídeos no fígado, porém inibem a formação de VLDL, agravando os quadros de esteatose hepática.

Uma molécula que pode auxiliar no diagnóstico das funções hepáticas é a albumina. Esta proteína tem diversas funções dentro do organismo, como auxiliar na pressão coloidosmótica e também auxiliar no transporte de algumas substâncias hidrofóbicas, como ácidos graxos, colesterol, além da bilirrubina e alguns íons (KANEKO et al., 2008). O sangue apresenta várias proteínas, sendo as principais a albumina, as globulinas e o fibrinogênio. Estas proteínas são sintetizadas principalmente no fígado e a diminuição da sua concentração pode estar relacionada com lesões hepáticas. Em momentos em que o quadro inflamatório foi resolvido, a concentração de albumina volta aos valores adequados, sendo considerada por alguns autores como uma proteína de fase aguda negativa, justamente por estar associada com a resolução do quadro inflamatório (ZOU et al., 2017).

Em revisão realizada por Overton et al. (2017), os autores constataram que não existem muitos trabalhos que caracterizam as alterações nas proteínas circulantes em vacas leiteiras durante o período de transição. Relataram ainda que a albumina permanece relativamente constante durante o período de transição, mas indicaram que alterações em seus níveis podem indicar alterações em relação à sanidade e reprodução. Estes autores sugeriram que mais trabalhos devem ser realizados para caracterizar a importância da albumina em nível de rebanho. Gonzalez et al. (2014) afirmam que em quadros de cetose é comum observar baixa concentração de albumina, mas em alguns casos não é possível detectar esta alteração. Os resultados da avaliação de albumina durante o período de transição são inconclusivos, pois nem sempre o mesmo comportamento é observado em diferentes estudos.

Logo que se iniciam as injúrias aos tecidos, inicia-se também uma resposta ao processo inflamatório, antes mesmo da resposta imune específica. As proteínas de fase aguda são uma resposta imediata às lesões causadas nas células, são bastante inespecíficas e desencadeiam efeitos sistêmicos para controlar a lesão tecidual (CONTIN et al., 2015). Dentro deste contexto podemos destacar a aspartato amino transferase (AST), assim como a alanina amino transferase (ALT), gama glutamil transferase (GGT) e glutamato desidrogenase.

Shin et al. (2015) avaliaram o perfil metabólico de vacas saudáveis ou com cetose durante o período de transição. Além de apresentarem maiores concentrações de AGNE e menos glicose



circulante, vacas com cetose tiveram maior concentração de AST, principalmente nas primeiras duas semanas após o parto. Nogalski et al. (2012) também confirmaram que vacas com cetose têm elevados níveis de AST, mas não observaram esse comportamento em vacas que tiveram retenção de placenta, mostrando que o AST é mais efetivo para identificação de lesões hepáticas do que outras doenças. Outro estudo conduzido por Elitok et al. (2010) demonstrou que vacas com cetose apresentaram maior concentração de AST e GGT do que vacas saudáveis, porém não houve diferença entre os níveis de ALT entre as categorias avaliadas.

Tremblay et al. (2018) destacaram que para avaliar a síndrome de má adaptação metabólica que as vacas podem passar no início da lactação, além de analisar BHB é importante considerar enzimas produzidas no fígado e a bilirrubina, associados a sinais clínicos como a redução da motilidade ruminal e queda na produção de leite. Estes autores ainda sugerem que em estudos futuros sejam feitas análises mais detalhadas da composição do leite para que estas informações possam ser utilizadas como parâmetros, auxiliando na identificação da síndrome de má adaptação metabólica.

A bilirrubina é um pigmento gerado a partir da degradação enzimática do grupo heme de eritrócitos velhos, é pouco solúvel em água, por isso é transportada na circulação ligada à albumina. Ela é processada pelas células do fígado e excretada através da bile. Duas situações comprometem mais a eliminação da bilirrubina da corrente sanguínea: perda de capacidade da função dos hepatócitos (lesão hepática) ou bloqueio da secreção da bile. A bilirrubina é caracterizada como indireta ou não conjugada, quando recém-sintetizada e ligada à albumina, pode sofrer alterações na sua concentração em situações de anemia hemolítica. Já a bilirrubina direta ou conjugada é aquela que já foi metabolizada pelo fígado e está associada ao ácido glicurônico. A bilirrubina total é a soma das porções direta e indireta (KANEKO et al., 2008). Estes pesquisadores afirmam que em quadros de fígado gorduroso associado a cetose é comum que a bilirrubina esteja aumentada, já que a capacidade dos hepatócitos de exercer suas funções está comprometida.

Em vacas saudáveis, os valores de bilirrubina apresentam um pequeno aumento pouco antes do parto e atingem um pico por volta do 7º dia pós-parto, retornando a valores normais entre a quarta e quinta semana de lactação (BERTONI e TREVISI, 2013). Crociati et al. (2017) dividiram vacas em dois grupos, um com alto HDL no período seco e outro com baixo HDL. Ao avaliarem os níveis de bilirrubina, os autores observaram que o grupo alto HDL apresentou menor concentração de bilirrubina total e indireta, além de ter uma menor relação AGNE/TG



do que o grupo com baixo HDL. Eles associaram esse resultado com uma melhor adaptação do fígado ao metabolismo lipídico.

Outra proteína de fase aguda negativa que pode auxiliar na identificação de alterações na função hepática é a paraoxidase. Esta proteína é sintetizada pelo fígado em situações de processo inflamatório, principalmente em resposta às citocinas. Uma baixa síntese desta proteína está correlacionada com quadros de intensa lipólise, podendo auxiliar na identificação do comprometimento dos hepatócitos (BIONAZ et al., 2007). Ceciliani et al. (2012) descreveu que animais saudáveis apresentam níveis de paraoxanase próximos a 83 U/ml, já durante uma resposta inflamatória, esses valores caem para cerca de 69 U/ml.

A haptoglobina, também uma proteína de fase aguda sintetizada pelo fígado, tem como principal função retirar a hemoglobina livre do sangue. Ao ligar-se com a hemoglobina, forma uma ligação irreversível e este complexo é rapidamente retirado do sangue também pelas células do fígado. Durante o processo inflamatório, a haptoglobina pode funcionar como um anti-inflamatório, atuando de diferentes maneiras para reduzir os processos inflamatórios (CECILIANI et al., 2012). Em um estudo de caso, van Dixhoorn et al. (2018) observou que vacas que tiveram um quadro pós-parto mais deficitário (vacas com menos resiliência) a haptoglobina foi maior e teve um pico mais estendido do que vacas saudáveis.

Na Tabela 1 está um resumo dos valores de referência para alguns analitos em bovinos como sugeridos por Duffield et al. (1998), Jackson e Cockcroft (2002) e Ospina et al. (2010b). Além desses, outros analitos e produtos de vias metabólicas, assim como componentes específicos do leite estão sendo avaliados como possíveis indicadores do metabolismo e da saúde animal durante o período de transição.

## 2.4 Doenças de vacas leiteiras no periparto

Como já destacado anteriormente, diversas alterações que ocorrem em bovinos leiteiros ao redor do parto fazem com que a imunidade fique comprometida e, principalmente quando associado a um inadequado manejo, podem desencadear diversas doenças.

TABELA 1 – VALORES DE REFERÊNCIA PARA DETERMINADOS ANALITOS EXAMINADOS NO SORO SANGUÍNEO DE BOVINOS.

Analito	Unidade	Valor
Albumina	g/dL	2,1 a 3,6
Aspartato aminotransferase (AST)	U/L	78 a 132
Bilirrubina direta	mg/dL	0,04 a 0,44
Bilirrubina total	mg/dL	0,01 a 0,50
Colesterol	mg/dL	65 a 220
Triglicerídeos	mg/dL	0 a 14
VLDL*	mg/dL	0 a 2,8
BHB <sup>1</sup>	mmol/L	< 1,20
AGNE <sup>2</sup>	mEq/L	< 0,57

\*Valores calculados através da fórmula  $VLDL = TG/5$ . <sup>1</sup>Ospina et al. (2010b); <sup>2</sup>Duffield et al. (1998). FONTE: Adaptado de Jackson e Cockcroft (2002).

Quanto mais cedo forem identificadas alterações fora do normal, mais rápido e eficiente pode ser a intervenção veterinária. Por isso Leblanc et al. (2006) afirmaram que a avaliação clínica nos primeiros 10 dias após o parto é uma ótima ferramenta de monitoramento de vacas leiteiras. Esta avaliação possibilita o diagnóstico de doenças que muitas vezes se manifestam na forma subclínica, afetando a saúde, o desempenho produtivo e reprodutivo desses animais.

É importante avaliar não só os animais, mas o manejo como um todo. Da mesma forma, se for possível identificar de maneira precoce o efeito prejudicial de alterações de manejo, mais rápido serão aplicadas as correções e os animais ficarão menos tempo em situação estressante (LUKAS et al., 2015). Estes autores indicaram que rebanhos com mais avaliações do período de transição apresentaram melhores resultados de produtividade no primeiro controle leiteiro após o parto.

A ocorrência de doenças no pós-parto é bastante variável entre países, regiões e até mesmo entre rebanhos de uma mesma região. Van Dorp et al. (1999) realizaram um estudo reunindo mais de 3 mil casos de doenças, analisados ao longo de toda a lactação. De todos os distúrbios que foram observados nesta pesquisa, 47,2% ocorreram nos primeiros 30 dias após o parto e outros 40,5% entre o dia 31 e o dia 150 (Tabela 2). Com exceção das desordens mastite e laminite, relativamente bem distribuídas ao longo da lactação, e cistos ovarianos, que apresenta maior incidência entre 31 e 150 dias pós-parto, todas as demais enfermidades relatadas apresentam uma nítida maior incidência nos primeiros 30 dias pós-parto. Isso evidencia o maior risco de desenvolvimento de doenças no período de transição. Alguns limites

foram sugeridos por Overton e Nydan (2009); 8% para retenção de placenta, 3% para hipocalcemia clínica, 3% para deslocamento de abomaso e 2% para cetose clínica.

Vergara et al. (2014) pesquisaram a incidência de doenças em quatro rebanhos leiteiros comerciais com predominância da raça Holandesa durante o período de transição (pré e pós-parto). Febre do leite apresentou taxas de incidência média de 1,1% (0 a 1,9%), retenção de placenta 12,3% (5,8 a 19,1%), metrite 17,1% (9,6 a 29,5%), cetose 15,8% (8,9 a 31,4%), deslocamento de abomaso 3,8% (2,3 a 4,8%), laminite 5,2% (1,2 a 13,0%), pneumonia 2,0% (0 a 5,7%) e cerca de 5,5% dos animais foram descartados precocemente do rebanho (3,2 a 8,7%).

Muitos estudos indicam que o período de maior incidência de doenças é justamente nos primeiros 30 dias pós-parto, sendo que na maioria das vezes está associado a algum evento ocorrido durante o período de transição. Outra característica muito comum de ser observada é uma queda no CMS antes mesmo da manifestação da doença, podendo ser um dos primeiros sinais demonstrados pelos animais frente a uma doença prestes a desencadear (Huzzey et al., 2007).

TABELA 2 – INCIDÊNCIA DE DESORDENS EM VACAS LEITEIRAS DE ACORDO COM O PERÍODO DE LACTAÇÃO.

Desordem	DEL até a ocorrência da primeira desordem			Total de casos
	0 – 30	31 - 150	151 - 365	
Edema de úbere	95,6%	0,9%	3,5%	113
Febre do leite	95,5%	1,5%	3,0%	133
Cetose	87,9%	10,3%	1,7%	58
Deslocamento de abomaso	73,3%	21,3%	5,3%	75
Retenção de placenta	100,0%	0,0%	0,0%	242
Metrite	51,8%	45,0%	3,2%	1230
Cisto ovariano	3,6%	74,7%	21,8%	588
Mastite	36,4%	37,5%	26,0%	653
Laminite	37,0%	35,9%	27,1%	192
Total	47,2%	40,5%	12,3%	3284

FONTE: Adaptado de VAN DORP et al. (1999).

Mulligan e Doherty (2008) destacam que quase todas as doenças estão interrelacionadas, podendo ocorrer uma cascata de eventos que desencadeiam mais de uma doença, agravando os quadros de saúde e prejudicando ainda mais o desempenho do animal.

As doenças de maneira geral causam um impacto negativo sobre a produtividade animal, e o prejuízo pode ser ainda maior quando elas acontecem no início da lactação. As perdas econômicas associadas às doenças do início da lactação causam um grande prejuízo, seja pelo custo do diagnóstico e tratamento, assim como pela perda em produtividade que as doenças causam aos animais acometidos (SUTHAR et al., 2013). Segundo Edwards e Tozer (2004), vacas doentes produziram cerca de 15 kg/dia menos leite de vacas sadias. Produções de leite apresentaram quedas significativas 6, 7 e 5 dias antes do diagnóstico de cetose, deslocamento de abomaso e desordens digestivas, respectivamente. Dessa forma os autores afirmam que estas enfermidades poderiam ser detectadas mais precocemente, se as informações de produção de leite diária forem usadas corretamente.

Obviamente, as doenças que se manifestam na sua forma clínica representam grande prejuízo. No entanto, as doenças frequentemente acontecem na forma subclínica, sendo difícil de ser detectada sem exames específicos. As formas subclínicas podem reduzir a produtividade de 10 a 30%, mas o produtor não consegue associar diretamente causa e efeito justamente por não conseguir identificar a enfermidade (BOUDA et al., 2000). Por isso, um monitoramento mais efetivo ajuda na identificação de doenças subclínicas, diminuindo as perdas em produtividade decorrentes desses eventos (Ospina et al., 2010a).

Em revisão escrita por Esposito et al. (2014), os autores afirmam que já está bem documentado que durante o período de transição muitas funções do sistema imune ficam comprometidas. É o caso, por exemplo, da atividade dos neutrófilos e a resposta dos linfócitos frente a estimulação mitogênica, além da grande produção de citocinas e o comprometimento da produção de anticorpos. A relatada imunossupressão, quando associada às mudanças metabólicas, nutricionais e endócrinas agrava os quadros de infecção, principalmente na metrite e mastite.

Allen e Piantoni (2013) relatam que a depressão no CMS que ocorre durante o período de transição estimula a liberação de AGNE do tecido adiposo para o fígado. A oxidação do AGNE no fígado estimula o centro de saciedade, agravando ainda mais a queda no CMS. Existe também um aumento na produção de citocinas pró-inflamatórias nessas condições. Assim, esses autores confirmam que a excessiva lipomobilização está diretamente relacionada com casos de fígado gorduroso, cetose e outras doenças metabólicas associadas à queda de CMS, como é o caso do deslocamento de abomaso.

Duffield et al. (2009) observaram que altos valores de BHB na primeira semana pós-parto estiveram associados com a incidência de deslocamento de abomaso, cetose clínica e metrite, porém não identificaram essa associação com casos de mastite clínica. Já Bicalho et al. (2017) afirmaram que os metabólitos utilizados para identificar o BEN (BHB e AGNE) não foram bons indicadores para casos de retenção de placenta, metrite e endometrite, pois não houve diferença entre vacas saudáveis e animais que apresentaram alguma dessas doenças. Porém, a perda em produção de leite foi associada a uma maior concentração destes metabólitos.

Avaliando animais sob pastejo, Sepúlveda-Varas et al. (2015) encontraram que a cada aumento de 0,3 pontos na concentração de BHB analisado na primeira semana após o parto, o risco do animal desenvolver metrite severa aumenta 1,95 vezes, reforçando a relação entre o BEN e ocorrência de doenças. Santschi et al. (2016) concluíram que a cetose é uma doença muito comum no pós-parto imediato e prejudica o desempenho animal no primeiro controle leiteiro após o parto.

Muitos trabalhos já demonstraram os efeitos negativos das doenças do período de transição e sua correlação com o BEN. Portanto, para que haja sucesso produtivo durante o período de transição, é necessário um acompanhamento adequado, monitorando e controlando a incidência dessas desordens.

## 2.5 Composição lipídica do leite bovino

O leite fluido é uma secreção proveniente das células da glândula mamária de animais mamíferos. De maneira simplificada, é possível classificar os componentes do leite como sólidos e água. Nos sólidos do leite bovino encontram-se proteínas, gorduras, açúcares (lactose) e minerais. A fração de sólidos e água, bem como a distribuição dos sólidos do leite, é variável entre as diferentes raças bovinas, inclusive entre indivíduos da mesma raça (González, 2001).

No início da lactação, a lactogênese tem maior prioridade em relação a outras atividades do organismo da vaca, como a reprodução, por exemplo. Com a queda drástica da progesterona na proximidade do parto, ativam-se sítios de ligação da prolactina nas células da glândula mamária, sendo que a produção de prolactina já vem sendo estimulada praticamente um mês antes do parto, com o aumento nos níveis de estrógeno. Por último, a somatotropina

vem para auxiliar no direcionamento dos nutrientes para a glândula mamária. Para a continuidade da lactogênese, os principais hormônios envolvidos são: prolactina, somatotropina, insulina, paratormônio, glicocorticoides e hormônio tireoestimulante (ARAÚJO et al., 2012). A prolactina tem papel fundamental na fase de proliferação dos alvéolos e no próprio estímulo à lactogênese. Quando a lactação já está estabelecida, a prolactina é estimulada pela sucção do bezerro ou pelo próprio ato de ordenhar (NEVILLE et al., 2002).

Além da proliferação e manutenção do tecido mamário, a insulina também está envolvida com a síntese de proteína do leite nos alvéolos mamários (MENZIES et al., 2009). Estes mesmos autores concluíram em sua pesquisa que a expressão gênica para a síntese de proteínas do leite é estimulada pela insulina em vários níveis, demonstrando a importância deste hormônio.

A gordura é o principal componente energético e com maior variabilidade na composição do leite bovino (BAUMAN et al., 2006), podendo variar em média de 2,5% até aproximadamente de 4,5% em vacas especializadas em produção de leite (GONZÁLEZ, 2001). Esta gordura é composta por 98% de TG e a principal diferença para o leite de monogástricos é o maior teor de ácidos graxos de cadeia curta.

A composição da gordura que está presente no leite é resultado de basicamente quatro vias: 1) alguns ácidos graxos absorvidos da dieta não passam por nenhuma modificação, são direcionados diretamente à glândula mamária e assim são incorporados ao leite; 2) outra parte dos lipídeos dietéticos sofre modificações no rúmen, por processos de biohidrogenação, lipólise ou de síntese bacteriana; 3) uma grande proporção dos ácidos graxos que compõe o leite é sintetizada na glândula mamária, a partir dos precursores que chegam pela circulação; e 4) uma quarta fonte são aqueles ácidos graxos mobilizados do tecido adiposo do animal, que vão para a circulação e podem ser conduzidos até a glândula mamária. Assim, a quantidade e composição da gordura do leite estão diretamente relacionadas com a obtenção dos ácidos graxos provenientes destas quatro vias (STOOP et al., 2009).

Aproximadamente 25% dos ácidos graxos encontrados no leite bovino são provenientes da dieta, outros 25% são de ácidos graxos presentes no plasma (modificados da dieta ou provenientes de lipomobilização) e 50% restante é sintetizado pelas células epiteliais da glândula mamária, pela síntese *de novo* (DEMEYER e DOREAU, 1999; BAUMAN et al., 2006). A via de síntese de AG na glândula mamária é conhecida como síntese “*de novo*”, sendo que o acetato proveniente do rúmen é o principal precursor. Entretanto, o 3-hidroxibutirato e

também o ácido butírico podem ser usados para esta síntese. Os ácidos graxos da síntese *de novo* são de cadeia curta e média (C4 a C14); já o C16 (palmitico) é proveniente 50% de síntese na glândula mamária e 50% proveniente da circulação. Os ácidos graxos de cadeia longa (acima de C16) são trazidos pela corrente sanguínea (VYAS et al, 2012; KESEK et al., 2014).

Já foram identificados mais de 400 ácidos graxos diferentes no leite bovino, sendo que o perfil é bastante variável. Mele et al. (2016) avaliaram diversos efeitos sobre a composição de ácidos graxos do leite de vacas Pardo-Suíço. Estes autores concluíram que rebanho, sistema de produção, manejo alimentar, status sanitário, bem como características individuais dos animais podem afetar o perfil de ácidos graxos do leite.

De maneira geral, 5% da gordura do leite bovino são ácidos graxos polinsaturados (AGPI), outros 25% são ácidos graxos monoinsaturados (AGMI) e a maior parte da gordura do leite bovino, cerca de 70%, são de ácidos graxos saturados (AGS). Quando classificados os AG segundo o tamanho da cadeia carbônica, a concentração média de ácidos graxos de cadeia curta (C4 a C10) representa 14%, ácidos graxos de cadeia média (C12 a C16) 44% e os ácidos graxos de cadeia longa  $\geq$  C18 (saturados e insaturados) podem representar cerca de 30% (STOOP et al., 2009). Outra característica comum a ser observada na gordura do leite de ruminantes é a presença de ácido linoleico conjugado (CLA), que são diferentes isômeros do ácido octadecadienóico *cis*-9, *cis*-12. Já foram demonstrados vários efeitos benéficos de CLAs específicos sobre a saúde, como ação anticarcinogênica, antidiabética, antiaterogênica e estimulante do sistema imune (MOVALIYA et al., 2014).

A formação de CLA está diretamente relacionada com algumas características da dieta, como a presença de AGPI. Esse tipo de AG é prejudicial aos microrganismos do rúmen, pois afeta a integridade da sua membrana e para diminuir o efeito tóxico, as bactérias ruminais fazem a biohidrogenação dos AGPI (MAIA et al., 2007). Um CLA que pode ser formado nesse processo é o CLA *trans*-10, *cis*-12, que tem efeito negativo sobre a síntese *de novo* na glândula mamária. Wang et al. (2014), utilizando células epiteliais primárias da glândula mamária de bovinos, concluíram que altas doses do CLA *trans*-10, *cis*-12 afetaram principalmente a expressão gênica da acetil-CoA carboxilase e também da sintase de ácidos graxos, duas enzimas fundamentais para a construção dos ácidos graxos via síntese *de novo*, causando uma queda na gordura do leite, principalmente de AGMI.

Gengler et al. (2016) sugeriram em revisão que a composição do leite está intimamente relacionada com os componentes que passam pela circulação sanguínea, podendo ser utilizado



para identificar o status sanitário, por exemplo. Apesar da análise do perfil de ácidos graxos realizada por cromatografia ainda ter um custo elevado e demorar alguns dias para ficar pronta, com o avanço dos equipamentos de leitura através de infravermelho, as análises mais detalhadas podem ficar mais acessíveis e serem realizadas com maior agilidade. Além dessa tecnologia em evidência, análises feitas através do leite podem ser mais rápidas e mais práticas em relação a análises sanguíneas (STÁDNÍK et al., 2015), o que pode trazer benefícios para técnicos e produtores.

Em revisão apresentada por Bastin et al. (2016), os autores comentam que a composição de AG no início da lactação é modificada por questão de alteração em duas vias principais de obtenção de AG. É esperado que no início da lactação uma maior quantidade de AG pré-formados (provenientes da lipomobilização) esteja disponível na circulação, justamente porque o BEN estimula a liberação de AGNE, que são direcionados para a glândula mamária. Além disso, a presença de AGNE liberados pela quebra do tecido adiposo exerce uma retroalimentação negativa sobre a síntese *de novo*, diminuindo a concentração de AG de cadeia curta e média (C4 a C14). Portanto, espera-se que no início da lactação o leite bovino apresente maior concentração de AG de cadeia longa do que os de cadeia curta.

Em trabalho conduzido por Rukkwamsuk et al. (2000) foi possível identificar que vacas leiteiras no pós-parto (0,5 a 3 semanas pós-parto) têm um aumento na concentração plasmática de ácido palmítico (C16:0), ácido esteárico (C18:0) e, principalmente, ácido oleico (C18:1). Os animais que foram sobrealimentados durante o período seco ainda tiveram um aumento maior que aqueles com restrição de energia. Assim, em função de 50% dos ácidos graxos do leite ser proveniente do plasma (seja aqueles que vêm da dieta via quilomícrons ou metabolizados pelo organismo), espera-se que haja também um aumento desses AG no leite de animais no pós-parto.

Van Haelst et al. (2008) observaram que vacas diagnosticadas com cetose apresentaram maiores concentrações de ácidos graxos de cadeia longa e também de C18:1 *cis*-9 (oleico) do que vacas que estavam saudáveis. Já Hostens et al. (2012) identificaram que vacas com deslocamento de abomaso no início da lactação apresentaram maior proporção de ácidos graxos de 16 e 18 carbonos no total de AGNE encontrado no plasma, indicando a predominância desses AG como resultado da lipomobilização. Assim, é provável que no leite de vacas que estejam em BEN também sejam encontrados valores mais elevados desses ácidos graxos. Em estudo conduzido por Jorjong et al. (2014) foi possível identificar uma correlação



positiva entre a concentração de AGNE no sangue e ácidos graxos de 18 carbonos no leite bovino, o que mostra que vacas que têm lipomobilização mais intensa apresentam maior proporção de ácidos graxos de 18 carbonos no leite.

Martin et al. (2015) encontraram uma diferença na concentração de C14:0, C16:0 e C18:1 *cis*-9 na primeira semana pós-parto para vacas que tiveram atividade luteal iniciada precoce ou tardiamente. Assim, esse estudo ressalta que determinados ácidos graxos também podem auxiliar na identificação de animais que poderão ter problemas reprodutivos.

Estes e vários outros trabalhos vêm indicando que a identificação do perfil de AG do leite no início da lactação pode trazer mais informações a respeito da intensidade e duração do BEN em vacas leiteiras durante este estágio. Portanto é necessário que estudos mais aprofundados sejam desenvolvidos, para correlacionar as alterações metabólicas e fisiológicas que ocorrem no início da lactação com o perfil de AG do leite bovino.

## 2.6 Considerações finais

Nas últimas décadas, muitos avanços foram alcançados sobre o entendimento do período de transição de fêmeas bovinas. Sabe-se que o BEN é uma condição fisiológica no início da lactação, porém, quando muito pronunciado agrava o status geral do animal, que já está comprometido pelas diversas alterações fisiológicas, endócrinas, hormomais e metabólicas.

As doenças decorrentes do inadequado manejo aplicado no período de transição, como é o caso da cetose, causam grande impacto econômico dentro dos rebanhos leiteiros. O estudo apresentado por McArt et al. (2015) concluiu que um caso de cetose custa em média U\$117. Muitos contabilizam apenas o custo com diagnóstico e tratamentos, mas as consequências negativas ao longo da lactação são ainda mais impactantes. Perda de produção, status sanitário comprometido, perdas reprodutivas, morte ou descarte involuntário são custos que os produtores acabam não computando e chegam a representar mais de 70% das perdas associadas a cetose, por exemplo.

Os resultados obtidos dos estudos científicos precisam de alguma maneira chegar de forma aplicável para os produtores e técnicos de campo. Para tanto é necessário que ferramentas práticas e acessíveis sejam desenvolvidas para avaliação dos animais dentro das propriedades.

Análises sanguíneas são relativamente fáceis de conseguir, porém a forma de coleta bem como a forma e tempo de armazenamento da amostra influenciam diretamente no resultado. Quanto mais ágil e prático o sistema de avaliação, maior a chance de funcionar no dia a dia da propriedade.

Cada vez mais a avaliação da composição do leite bovino vem sendo estudada e aprofundada. Pequenas moléculas, às vezes presente em pequenas quantidades, podem auxiliar de maneira eficiente na detecção de doenças metabólicas, como é o caso de determinados ácidos graxos. Com o avanço da tecnologia de análise da composição através de sistemas infravermelhos, as avaliações minuciosas serão cada vez mais acessíveis, tanto em custo quanto em tempo de execução, sem contar o quão não-invasivas são estas análises do leite.

Portanto, promover o desenvolvimento e disseminação de ferramentas de avaliação de vacas durante o período de transição é de grande importância não só para a comunidade científica, mas também para aqueles que trabalham diretamente no manejo dos animais a campo, buscando máxima eficiência para atender as exigências cada vez mais detalhistas do mercado consumidor.

### 3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDELI, A. et al. Elevated non-esterified fatty acid and  $\beta$ -hydroxybutyrate in transition dairy cow and their association with reproductive performance and disorders: a meta-analysis. **Theriogenology**, v.93, p.99-104, 2017.
- ALLEN, M. S.; PIANTONI, P. Metabolic control of feed intake: Implication of metabolic disease of fresh cows. **Veterinary Clinics: Food Animal Practice**, v.29, p.279-297, 2013.
- ALMEIDA, R. et al. Culling reasons and the association of herd size and milk yield with culling rates in dairy herds in southern Brazil. American Dairy Science Association & American Society of Animal Science Joint Annual Meeting, 15 a 19 de julho, Phoenix, Arizona, Estados Unidos, **Journal of Dairy Science**, v.95, Suppl.2, p.92, 2012.
- ARAÚJO, G. D. et al. Aspectos morfológicos e fisiológicos de glândulas mamárias de fêmeas bovinas - revisão de literatura. **PUBVET**, v.6, n.36, 2012.
- BARLETTA, R. V. et al. Association of changes among body condition score during the transition period with NEFA and BHBA concentrations, milk production, fertility, and health of Holstein cows. **Theriogenology**, v.104, p.30-36, 2017.
- BASTIN, C.; GENGLER, N.; SOYEURT, H. phenotypic and genetic variability of production traits and milk fatty acid contents across days in milk for Walloon Holstein first-parity cows. **Journal of Dairy Science**, v.94, n.8, p.4152-4163, 2011.
- BAUMAN, E. D. et al. Major advances associated with the biosynthesis of milk. **Journal of Dairy Science**, v.89, n.4, p.1235-1243, 2006.
- BERTONI, G.; TREVISI, E. Use of the liver activity index and other metabolic variables in the assessment of metabolic health in dairy herds. **Veterinary Clinics: Food Animal Practice**, v.29, p.413-431, 2013.
- BICALHO, M. I. S. et al. The association of plasma glucose, BHBA, and NEFA with postpartum uterine diseases, fertility, and milk production of Holstein dairy cows. **Theriogenology**, v.88, p.270-282, 2017.
- BIONAZ, M. et al. Plasma paraoxonase, health, inflammatory conditions, and liver function in transition dairy cows. **Journal Dairy Science**, v.90, n.4, p.1740-1750, 2007.
- BOUDA, J.; MARTÍNEZ, L. P.; QUEIROZ-ROCHA, G. F. **Sistema de diagnóstico das doenças metabólicas no bovino**. In: GONZÁLEZ, F. H. D.; BORGES, J. B.; CECIM, M. Uso de provas de campo e laboratório clínico em doenças metabólicas e ruminais dos bovinos. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2000. p.17-18.
- BRICKNER, A. E.; RASTANI, R. R.; GRUMMER, R. R. Technical Note: Effect of sampling protocol on plasma non esterified fatty acid concentration in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v.90, p.2219-2222, 2007.
- BRUSS, M. L. Lipids and ketones. IN: KANEKO, J. J.; HARVEY, J. W.; BRUSS, M. L. (eds.), In: **Clinical biochemistry of domestic animals**. 6 ed. San Diego: Academic Press, p.81-115, 2008.

CALAMARI, L. et al. Assessment of the main plasma parameters included in a metabolic profile of dairy cow based on Fourier Transform mid-infrared spectroscopy: preliminary results. **BMC Veterinary Research**, v.12, n.4, p.1-10, 2016.

CECILIANI, F. et al. Acute phase proteins in ruminants. **Journal of Proteomics**, v.75, p.4207-4231.

CECILIANI, F. et al. Proteomics and metabolomics characterizing the pathophysiology of adaptive reactions to the metabolic challenges during the transition from late pregnancy to early lactation in dairy cows. **Journal of Proteomics**, v.178, p.92-106, 2018.

CHAMBERLIN, W. G. et al. Subclinical hypocalcemia, plasma biochemical parameters, lipid metabolism, postpartum disease, and fertility in postparturient dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 96, n. 11, p. 7001-7013, 2013.

CHEW, B. P.; MURDOCK, F. R.; RILEY, R. E.; HILLERS, J. K. influence of prepartum dietary crude protein on growth hormone, insulin, reproduction, and lactation of dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v.67, p.270-275, 1984.

CHUNG, Y. M. et al. Effects of prepartum dietary carbohydrate source and monensin on periparturient metabolism and lactation in multiparous cows. **Journal of Dairy Science**, v.91, p.2744-2758, 2008.

CONTIN, C. M. Proteínas de fase aguda: revisão de literatura. **Investigação**, v.14, n.2, p.73-76, 2015.

CROCIATI, M. et al. Influence of lipoproteins at dry-off on metabolism of dairy cows during transition period and on postpartum reproductive outcomes. **Theriogenology**, v.94, p.31-36, 2017.

DEMEYER, D.; DOREAU, M. Targets and procedures for altering ruminant meat and milk lipids. **Proceedings of the Nutrition Society**, v.58, p.593-607, 1999.

DJOKOVIĆ, R. et al. Endocrine and metabolic status of dairy cows during transition period. **Thai Journal of Veterinary Medicine**, v.44, n.1, p.59-66, 2014.

DRACKLEY, J. K. Biology of dairy cows during the transition period: the final frontier? **Journal of Dairy Science**, v.82, p.2259-2273, 1999.

DÓREA, J. R. R.; FRENCH, E. A.; ARMENTANO, L. E. Use of milk fatty acids to estimate plasma nonesterified fatty acid concentrations as an indicator of animal energy balance. **Journal of Dairy Science**, v.100, n.8, p.1-13, 2017.

DUBUC, J. et al. Risk factors for postpartum uterine diseases in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v.93, p.5764-5771, 2010.

DUFFIELD, T. F. et al. Efficacy of monensin for the prevention of subclinical ketosis in lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v.81, p.2866-2873, 1998.

DUFFIELD, T. F.; BAGG, R. Herd level indicators for the prediction of high-risk dairy herds for subclinical ketosis. In: Annual Convention of the American Association of Bovine Practitioners, 35., 2002, Ohaio. **Proceedings...** Ohaio, 2002, p.175-176.

DUFFIELD, T. F., LEBLANC, S. J. Interpretation of serum metabolic parameters around the transition period. In: **Southwest Nutrition and Management Conference**, 24, Arizona, p.106-114, 2009.

DUFFIELD, T. F. et al. Impact of hyperketonemia in early lactation dairy cows on health and production. **Journal of Dairy Science**, v.92, n2, p.571-580, 2009.

EDGERTON, L. A.; HAFS, I. I. D. Serum luteinizing hormone, prolactin, glucocorticoid, and progestagens in dairy cows from calving to gestation. **Journal of Dairy Science**, v.56, p.451-458, 1973.

EDWARDS, J. L.; TOZER, P. R. Using activity and milk yield as predictors of fresh cow disorders. **Journal of Dairy Science**, v.87, p.524-531, 2004.

ELITOK, B. et al. Clinical, haematological, serum biochemical and cytogenetic study in cows with primary ketosis. **Pakistan Veterinary Journal**, v.30, n.3, p.150-154, 2010.

ESPOSITO, G. et al. Review article: Interactions between negative energy balance, metabolic diseases, uterine health and immune response in transition dairy cows. **Animal Reproduction Science**, v.144, p. 60-71, 2014.

FERNANDES, S. R. et al. Lipidograma como ferramenta na avaliação do metabolismo energético em ruminantes. **Revista Brasileira de Agrociência**, v.8, n.1, p.21-32, 2012.

FUCK, E. J.; MORAES, G. V.; SANTOS, G. T. Fatores nutricionais na reprodução das vacas leiteiras. I. Energia e proteína. **Revista Brasileira Reprodução Animal**, v.24, n.3, p.147-161, 2000.

GENGLER, N. et al. Capitalizing on fine milk composition for breeding and management of dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v.99, n.5, p. 4071-4079, 2016.

GOFF, J. P.; HORST, R. L. Physiological changes at parturition and their relationship to metabolic disorders. **Journal of Dairy Science**, v.80, p.1260-1268, 1996.

GOFF, J. P. Como controlar a febre do leite e outras desordens metabólicas relacionadas à macro minerais em vacas de leite. In: XIII CURSO DE NOVOS ENFOQUES NA PRODUÇÃO E REPRODUÇÃO DE BOVINOS, 2009, Uberlândia. **Anais...** Botucatu: Universidade Estadual Paulista, 2009, p.267-284. CD-ROM.

GONZALEZ, F. H. D. **Composição bioquímica do leite e hormônios da lactação**. In: Uso do leite para monitorar a nutrição e o metabolismo de vacas leiteiras. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre. 2001.

GONZALEZ, F. H. D.; VALLE, S. F.; SILVA, S. C. da. **Patologia clínica veterinária: uma abordagem sobre casos clínicos**. Porto Alegre: Edição dos Autores, 2014.

GRUMMER, R. R. Impact of changes in organic nutrient metabolism on feeding the transition dairy cow. **Journal of Dairy Science**, v.73, p.2820-2833, 1995.

GRUMMER, R. R.; RASTANI, R. R. Why reevaluate dry period length? **Journal of Dairy Science**, v.87, p.77-85, 2004.

HAYIRLI, A. et al. Animal and dietary factors affecting feed intake during the prefresh transition period in Holsteins. **Journal of Dairy Science**, v.85, p.3430-3443, 2002.

- HOSTENS, M. et al. The fatty acid profile of subcutaneous and abdominal fat in dairy cows with left displacement of the abomasum. **Journal of Dairy Science**, v.95, n.7, p.3756–3765, 2012.
- HUTJENS, M.; AALSETH, E. **Caring for transition cows**. W.D. Hoards & Sons Company, 64p., 2005.
- HUZZEY, J. M. et al. Prepartum behavior and dry matter intake identify dairy cows at risk for metritis. **Journal of Dairy Science**, v.90, p.3220-3233, 2007.
- IMHASLY, S. et al. Blood plasma lipidome profile of dairy cows during the transition period. **BMC Veterinary Research**, v.11, n.252, p. 1-14, 2015.
- JACKSON, P. G. G.; COCKCROFT, P. D. Laboratory Reference Values: Biochemistry. In: JACKSON, P. G. G.; COCKCROFT, P. D. **Clinical Examination of Farm Animals**. Oxford: Blackwell Science Ltd, 2002. p.303-305.
- JIA, H. Perilipin 5 promotes hepatic steatosis in dairy cows through increasing lipid synthesis and decreasing very low density lipoprotein assembly. **Journal of Dairy Science**, v.102, p.833-845, 2019.
- JORJONG, S. et al. Milk fatty acids as possible biomarkers to early diagnose elevated concentrations of blood plasma nonesterified fatty acids in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v.97, n.11 p.7054-7064, 2014.
- JORRITSMA, R. et al. Metabolic changes in early lactation and impaired reproductive performance in dairy cows. **Veterinary Research**, v.34, p.11-26, 2003.
- JUCHEM, S. O. et al. Production and blood parameters of Holstein cows treated prepartum with sodium monensin or propyleneglycol. **Journal of Dairy Science**, v.87, p.680-689, 2004.
- KARIMIAN, M. et al. Effect of prepartal and postpartal dietary fat level on performance and plasma concentration of metabolites in transition dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v.98, p.330-337, 2015.
- KAYANO, M.; KIDA, K. Identifying alterations in metabolic profiles of dairy cows over the past two decades in Japan using principal component analysis. **Journal of Dairy Science**, v.98, p.8764-8774, 2015.
- KESEK, M.; SZULC, T.; ZIELAK-STECIWKO, A. Genetic, physiological and nutritive factors affecting the fatty acid profile in cows' milk – a review. **Animal Science Papers and Reports**, v.32, n.2, p.95-105, 2014.
- KESSLER, E. C. et al. Cholesterol metabolism, transport, and hepatic regulation in dairy cows during transition and early lactation. **Journal of Dairy Science**, v.97, p.5481-5490, 2014.
- KRAMER, E. et al. Analysis of water intake and dry matter intake using different lactation curve models. **Journal of Dairy Science**, v.92, p.4072-4081, 2009.
- KUNZ, A. B. R.; RUDE, E. Insulin-specific T cell hybridomas derived from (H-2b × H-2k) F1 mice preferably employ F1unique restriction elements for antigen recognition. **European Journal of Immunology**, v.15, p.1048-1054, 1985.



- LAGO, E. P. et al. Parâmetros metabólicos de vacas leiteiras durante o período de transição pós-parto. **Revista Brasileira de Ciências Veterinárias**, v.11, n.1, p.98-103, 2004.
- LEBLANC, S. J.; LESLIE, K. E.; DUFFIELD, T. F. Metabolic predictors of displaced abomasum in dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, v.88, p.159-170, 2005.
- LEBLANC, S. J. et al. Major advances in disease prevention in dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, v.89, p.1267-1279, 2006.
- LI, Y. et al. An association between the level of oxidative stress and the concentrations of NEFA and BHBA in the plasma of ketotic dairy cows. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, v.100, p.844-851, 2016.
- LUKAS, J. M. et al. a study of methods for evaluating the success of the transition period in early-lactation dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v.98, n.1, p.250-262, 2015.
- LUKE, T. D. W. et al. Metabolic profiling of early-lactation dairy cows using milk mid-infrared spectra. **Journal of Dairy Science**, v.102, n.2, p.1747-1760, 2019.
- LEFEBVRE, D. L'alimentation em période de transition. In: **Les bovins laitiers – Nutrition et alimentation**, Centre de Reference en Agriculture et Agroalimentaire du Québec (CRAAQ). Comité Bovins Laitiers, p.1001-1017, 2008.
- MAIA, M. R. G. et al. Metabolism of polyunsaturated fatty acids and their toxicity to the microflora of the rumen. **Antonie van Leeuwenhoek**, v.91, p.303-314, 2007.
- MARTIN, A. D. et al. The relationship between fatty acid profiles in milk identified by Fourier transform infrared spectroscopy and onset of luteal activity in Norwegian dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, v.98, n.8, p.5374-5384, 2015.
- MARTINEZ, N. et al. Evaluation of peripartal calcium status, energetic profile, and neutrophil function in dairy cows at low or high risk of developing uterine disease. **Journal of Dairy Science**, p. 7158-7172, 2012.
- MCART, J. A. A. et al. Epidemiology of subclinical ketosis in early lactation dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, v.95, p.5056-5066, 2013.
- MCART, J. A. A. et al. Hyperketonemia in early lactation dairy cattle: A deterministic estimate of component and total cost per case. **Journal of Dairy Science**, v.98, n3, p.2043-2054, 2015.
- MELE, M. et al. Multivariate factor analysis of detailed milk fatty acid profile: Effects of dairy system, feeding, herd, parity, and stage of lactation. **Journal of Dairy Science**, v.99, n.12, p.9820-9833, 2016.
- MENZIES, K. K. Insulin regulates milk protein synthesis at multiple levels in the bovine mammary gland. **Functional Integrative Genomics**, v.9, p.197-217, 2009.
- MOVALIYA, J. K. et al. Nutritional strategy for designer milk with fat constituents beneficial for human health – a review. **Agricultural Reviews**, v.35, n.1, p.42-49, 2014.
- MULLIGAN, F. J.; DOHERTY, M. L. Production diseases of the transition cow. **The Veterinary Journal**, v.176, p.3-9, 2008.
- NATIONAL RESEARCH COUNCIL (NRC). **Nutrient Requirements of Dairy Cattle**. 7. ed. Washington: National Academy Press. 2001. 380p.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de bioquímica de Lehninger**. Porto Alegre: Artmed, 2011. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2014.

NEVILLE, M. C.; MCFADDEN, T. B.; FORSYTH, I. Hormonal regulation of mammary differentiation and milk secretion. **Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia**, v.7, n.1, p.49-66, 2002.

NOGALSKI, Z. Changes in the blood indicators and body condition of high yielding Holstein cows with retained placenta and ketosis. **Acta Veterinaria BRNO**, v.81, p.359-364, 2012.

OETZEL, G. R. Monitoring and testing dairy herds for metabolic disease. **Veterinary Clinics Food Animal Practice**. v.20, p.651-674, 2004.

OSPINA, P. A. et al. Evaluation of nonesterified fatty acids and  $\beta$ -hydroxybutyrate in transition dairy cattle in the northeastern United States: Critical thresholds for prediction of clinical diseases. **Journal of Dairy Science**, v.93, p.546-554, 2010a.

OSPINA, P. A. et al. Associations of elevated nonesterified fatty acids and  $\beta$ -hydroxybutyrate concentrations with early lactation reproductive performance and milk production in transition dairy cattle in the northeastern United States. **Journal of Dairy Science**, v.93, p.1596-1603, 2010b.

OVERTON, T. R.; WALDRON, M. R. Nutritional management of transition dairy cows: strategies to optimize metabolic health. **Journal of Dairy Science**, v.87, supplement, p.105-119, 2004.

OVERTON, T. R.; NYDAM, D. V. Como identificar oportunidades no manejo de vacas periparto. In: CURSO DE NOVOS ENFOQUES NA PRODUÇÃO E REPRODUÇÃO DE BOVINOS, 13., 2009, Uberlândia. **Anais...** Botucatu: Universidade Estadual Paulista, 2009, p.285-290. CD-ROM

OVERTON, T. R.; MCART, J. A. A.; NYDAM, D. V. A 100-Year Review: Metabolic health indicators and management of dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, v.100, p.10398-10417, 2017.

PAPE-ZAMBITO, D. A.; MAGLIARO, A. L.; KENSINGER, R. S. Concentrations of 17  $\beta$ -estradiol in Holstein whole milk. **Journal of Dairy Science**, v.90, p.3308-3313, 2007.

PAYNE, J.M., et al. The use of metabolic test in dairy herds. **Veterinary Record**, v.87, p.150-157, 1970.

PETHES, G. et al. Thyroxine, triiodothyronine, reverse-triiodothyronine, and other physiological characteristics of periparturient cows fed restricted energy. **Journal of Dairy Science**, v.68, p.1148-1154, 1985.

PINEDO, P. J. et al. Dynamics of culling for Jersey, Holstein, and Jersey  $\times$  Holstein crossbred cows in large multibreed dairy herds. **Journal of Dairy Science**, v.97, p.2886-2895, 2014.

POGLIANI, F. C. et al. Influência da gestação e do puerpério no lipidograma de bovinos da raça Holandesa. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.62, n.2, p.273-280, 2010.



PONCHEKI, J. K. et al. Analysis of daily body weight of dairy cows in early lactation and associations with productive and reproductive performance. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.44, n.5, p.187-192, 2015.

PRODANOVIĆ, R. et al. Use of metabolic profiles and body condition scoring for the assessment of energy status of dairy cows. **Biotechnology in Animal Husbandry**, v.28, n.1, p.25- 32, 2012.

RABELO, E.; CAMPOS, B. G. Fisiologia do período de transição. *Ciência Animal Brasileira*, Suplemento I: VII Congresso Brasileiro de Buiatria, **Anais...** 2009.

RAMIRES, C. H. et al. Blood parameters in transition dairy cattle and their effects on milk production. **Journal of Dairy Science**, v.97, sup.1, p.731-732, 2014.

RASTANI, R. R. et al. Effects of increasing milking frequency during the last 28 days of gestation on milk production, dry matter intake, and energy balance in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v.90, p.1729-1739, 2007.

REINCKE, K., SAHA, A., WYRZYKOWSKI, Ł. **The global dairy world 2017/18 - Results of the IFCN dairy report 2018**. Kiel: IFCN Dairy Research Network, 2018. Relatório técnico. Disponível em: <<https://ifcndairy.org/ifcn-dairy-report-2018/>>. Acesso em: 16 dez. 2018.

REYNOLDS, C. K. et al. Splanchnic metabolism of dairy cows during the transition from late gestation through early lactation. **Journal of Dairy Science**, v.86, p.1201-1217, 2003.

RUKKWAMSUK, T. et al. Interrelation of fatty acid composition in adipose tissue, serum, and liver of dairy cows during the development of fatty liver postpartum. **Journal of Dairy Science**, v.83, p.52-59, 2003.

RUPRECHTER, G. et al. Metabolic predictors of peri-partum diseases and their association with parity in dairy cows. **Research in Veterinary Science**, v.118, p.191-198, 2018.

SANTOS, J. E. P.; SANTOS, F. A. P. Novas Estratégias no Manejo e Alimentação de Vacas Pré-Parto. In: *Animal Production Symposium: Bovine Confinement*. **Proceedings...** Piracicaba: USP. 1998, p. 165-214.

SANTOS, G.T.; DAMASCENO, J.C.; DA SILVA-KAZAMA, D. Manejo de vacas em lactação, secas e em período de transição. In: **Bovinocultura Leiteira: bases zootécnicas, fisiológicas e de produção**. Santos et al. (Organizadores). p.109-141, 2010.

SCHLEGEL, G. et al. Changes in the expression of hepatic genes involved in cholesterol homeostasis in dairy cows in the transition period and at different stages of lactation. **Journal of Dairy Science**, v.95, p.3826-383, 2012.

SEIFI, H. A. et al. Metabolic predictors of post-partum diseases and culling risk in dairy cattle. **The Veterinary Journal**, v.188, p. 216-220, 2011.

SEJERSEN, H., et al. Liver protein expression in dairy cows with high liver triglycerides in early lactation. **Journal of Dairy Science**, v.95, p.2409-2421, 2012.

SEPÚLVEDA-VARAS, P. et al. Transition diseases in grazing dairy cows are related to serum cholesterol and other analytes. **Plos One**, v.10, n.3, p.1-13, 2015.

SHIN, E. K. et al. Relationships among ketosis, serum metabolites, body condition score, and reproductive outcomes in dairy cows. **Theriogenology**, v.84, p.252-260, 2015.

STÁDNÍK, L. et al. Relationships between milk fatty acids composition in early lactation and subsequent reproductive performance in Czech Fleckvieh cows. **Animal Reproduction Science**, v.155, p.75-79, 2015.

STOOP, W. M. et al. Effect of lactation stage and energy status on milk fat composition of Holstein-Friesian cows. **Journal of Dairy Science**, v.92, p.14691478, 2009.

SUTHAR, V. S. et al. Prevalence of subclinical ketosis and relationships with postpartum diseases in European dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v.96, p.2925-2938, 2013.

TREMBLAY, M. et al. Identifying poor metabolic adaptation during early lactation in dairy cows using cluster analysis. **Journal of Dairy Science**, v.101, p.7311-7321, 2018.

VAN DIXHOORN, I. D. E. Indicators of resilience during the transition period in dairy cows: a case study. **Journal of Dairy Science**, v.101, n.11, p.10271-10282, 2018.

VAN DORP, R. T. E. et al. An epidemiologic study of disease in 32 registered Holstein dairy herds in British Columbia. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v.63, p.185-192, 1999.

VAN HAELST, Y. N. T. et al. Short communication: elevated concentrations of oleic acid and longchain fatty acids in milk fat of multiparous subclinical ketotic cows. **Journal of Dairy Science**, v.91, n.12, p. 4683-4686, 2008.

VERGARA, C. F. et al. Risk factors for postpartum problems in dairy cows: explanatory and predictive modeling. **Journal of Dairy Science**, v.97, n.7, p. 4127-4140, 2014.

VYAS, D.; TETER, B. B.; ERDMAN, R. A. Milk fat responses to dietary supplementation of short- and medium-chain fatty acids in lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v.95, n.9, p. 5194-5202, 2012.

ZACHUT, M. et al. Characterization of the endocannabinoid system in subcutaneous adipose tissue in periparturient dairy cows and its association to metabolic profiles. **Plos One**, v.13, n.11, p.1-22, 2018.

ZOU, Y. et al. Effects of feeding untreated, pasteurized and acidified waste milk and bunk tank milk on the performance, serum metabolic profiles, immunity, and intestinal development in Holstein calves. **Journal of Animal Science and Biotechnology**, v.8, n.53, p.1-11, 2017.

WANG, H. et al. High-level exogenous trans10, cis12 conjugated linoleic acid plays an anti-lipogenesis role in bovine mammary epithelial cells. **Animal Science Journal**, v.85, p.744-750, 2014.

WANKHADE, P. R. et al. Metabolic and immunological changes in transition dairy cows: A review. **Veterinary World**, v.10, n.11, p.1367-1377, 2017.

WILDMAN, E.E. et al. A dairy cow body condition system and its relationship to selected production characteristics. **Journal of Dairy Science**, v.65, n.3, p.495-501, 1982.

WITTEWER, F. Diagnóstico dos desequilíbrios metabólicos de energia em rebanhos bovinos. In: GONZÁLEZ, F.H.D.; BARCELLOS, J.O.; OSPINA, H. et al. (Eds.) **Perfil metabólico em**

**ruminantes: seu uso em nutrição e doenças nutricionais.** Porto Alegre: Editora da UFRGS, 2000. p.9-22.

## CAPÍTULO II – EFFECTS OF HIGH $\beta$ -HYDROXYBUTYRATE IN EARLY LACTATION COWS: PRODUCTION, REPRODUCTION AND HEALTH

High BHB: production, reproduction and health

### Effects of high $\beta$ -hydroxybutyrate in early lactation cows: production, reproduction and health

J. K. Poncheki\*, P. M. de Souza\*, D. P. D. Lanna†, R. Almeida\*<sup>1</sup>

\*Programa de Pós-graduação em Zootecnia, Universidade Federal do Paraná - UFPR,

†Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo -

ESALQ/USP

<sup>1</sup>Corresponding author: [ralmeida@ufpr.br](mailto:ralmeida@ufpr.br)

**Effects of high  $\beta$ -hydroxybutyrate in early lactation cows: production, reproduction and health. Poncheki et al.** Typically, cows undergo to a negative energy balance in early lactation. In order to supply energy requirements, adipose tissue is mobilized, releasing fatty acids and secondary metabolites are produced, such as beta-hydroxybutyrate (BHB). Cows that produce more milk in first 100 DIM had intermediate values of BHB in early lactation. High BHB in first 10 days after calving did not affect incidence diseases, culling or death until 60 DIM, but can affect days to first insemination.

### ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the effects of high BHB in early lactation on milk yield, health and reproduction of dairy cows. Data from 694 Holstein cows, 314 primiparous and 380 multiparous, calved between September 2015 and August 2016 in a commercial dairy herd in Southern Brazil was used. Milk and blood samples between 4

and 15 DIM were collected to evaluate milk composition and metabolic profile. In day 5 and 10 after calving, BHB was also measured using ketone test strips and BCS was evaluated. Ketosis prevalence was determined if BHB  $\geq 1.20$  mmol/L in day 5 or 10 after calving. Individual incidence diseases and milk production were recorded using production software, both cumulative milk yield and milk yield average in the first 30 or 100 DIM were evaluated. Reproductive outcomes were assessed using days to first insemination (D1AI), days open (DO), number of inseminations for pregnancy (TAI), pregnancy rate at first AI (P1AI), pregnancy rate at 150 DIM (P150D), and pregnancy loss after first insemination (PL1AI). In order to run statistical analysis, CORR, GLIMMIX, and LOGISTIC procedures from SAS software were used. Only small correlations between BHB and metabolic and productive variables were observed. There was no difference ( $P>0.10$ ) in milk yield between cows with BHB  $\geq 1.20$  mmol/L or healthy cows, but cows with intermediate BHB (between 0.7 and 1.20 mmol/L) produce more milk ( $P<0.05$ ) than very low BHB cows and ketotic cows. Animals with clinical ketosis (BHB  $\geq 2.90$  mmol/L) had higher ( $P<0.05$ ) AST and direct bilirubin than healthy cows, but cholesterol, triglycerides, VLDL and indirect bilirubin did not differ ( $P>0.05$ ) according to BHB categories. Cows with BHB  $\geq 1.20$  mmol/L showed higher ( $P<0.05$ ) D1AI than healthy cows, but others reproductive outcomes did not ( $P>0.05$ ) differ. Only a tendency ( $P<0.10$ ) was observed between BHB level and incidence of one disease up to 60 DIM and there are no effect ( $P>0.10$ ) of BHB in culling or death until 60 DIM. It seems that BHB concentration in early lactation is not an effective tool to identify subsequent incidence diseases. More productive cows had pre-ketotic values of BHB, reinforcing that cows need to undergo a slight NEB early lactation. However, high BHB concentration in first days after calving may impair subsequent productive and reproductive performance.

Key words: early culling, hyperketonemia, incidence disease, negative energy balance.

## INTRODUCTION

The first great challenge to postpartum dairy cows is to sustain a high milk yield faced a DMI that no supply all requirements, combination known as negative energy balance (NEB) (ESPOSITO et al., 2014). They need to supply this high energy demand by fat mobilization in adipose tissue. This lipomobilization releases non-esterified fatty acids (NEFA) and can be used by different pathways, including be directed to mammary gland where will be incorporated in milk fat or be metabolized in liver. In the liver, NEFA can be completely oxidized to energy, re-esterified to triglycerides or be partially oxidized and generate  $\beta$ -hydroxybutyrate (BHB) (LEBLANC, 2010).

BHB is considerate an important metabolite to evaluate NEB intensity (CHUNG et al., 2008) and can be measured by handheld electronic meter on farm, accelerating decision-making about a cow. The ideal time to evaluate BHB levels is the first two weeks after calving and values above or equal 1.2 mmol/L are associated with subclinical ketosis and  $\text{BHB} \geq 2.9$  mmol/L are associated with clinical ketosis (OSPINA et al., 2010).

Clinical ketosis events can cost U\$134 and U\$111, from primiparous and multiparous cows, respectively, and reproduction loss (36% of cost), future milk production loss (26% of cost) and death loss (26% of cost) are the most impacting factors in the total cost (McArt et al., 2015). The major problem is the subclinical occurrence, which can reduce milk production, reproductive success and compromises immune system (MCART et al., 2013; SUTHAR et al., 2013).

Elevated levels of NEFA and BHB are correlated with lower DMI, but moreover it seems they worsen immunocompetence, postpartum diseases, fertility problems and lessen milk production (WANKHADE et al., 2017). If NEB is very intense and lasts for

a long time, animals can develop problems that can have reflects during all lactation (DUFFIELD et al., 2009; SANTACHI et al., 2016).

The period from calving to peak lactation accumulates metabolic and nutritional challenges, on other hand, just after peak, cows need to conceive, in order to maintain adequate calving interval (WITTWER, 2000). Ketone bodies negatively affect the beginning and effectiveness (ovulation) of estrous cycle in dairy cows, but success at first insemination is not clearly correlated with BHB levels (LING et al., 2007; SHIN et al., 2015). Bisinotto et al. (2012) reviewed that NEFA and BHB had immunosuppressive effect and can delay uterine involution, compromising the reproductive activity onset.

Therefore, is very important to monitor management and animals in the first few days after calving, to identify cows undergoing more challenge, which may develop problems related to NEB (LUKAS et al., 2015).

The aim of this study was to evaluate the effects and correlations of BHB concentration in first days after calving on subsequent milk production, diseases incidence, culling or death and reproductive outcomes of Holstein dairy cows.

## MATERIAL AND METHODS

All animal procedures were approved by the Animal Care and Use Committee from Federal University of Paraná State (CEUA-UFPR), under protocol number 064/2016. The study was conducted in a commercial dairy herd located in Palmeira county, Paraná State, Southern Brazil. Data was collected from 694 Holstein cows, 314 primiparous and 380 multiparous, calving between September 2015 to August 2016. Cows were confined in free-stall system, and milked three times per day. They were moved from the far-off to the close-up group 25-30 days before the expected calving date,

so these cows were supplemented with an anionic diet for at least 21 days before calving.

After calving, cows were kept in the fresh group for a period ranging from 15 to 30 days.

This group was monitored daily, via clinical examination done by a veterinarian and with assistance of a rumination monitoring system (SCR, Allflex Livestock Intelligence<sup>®</sup>, USA), to identify possible diseases. All diseases and culling or death occurrence were recorded using DELPRO<sup>®</sup> (DeLaval Inc, Missouri, USA). Cows with diseases were moved to “hospital lot”, to receive treatment and intensive care. Diseases identified in early lactation were: retained placenta, metritis, uterus adherence, cervicitis, uterine discharge, displacement of abomasum, diarrhea, fever, mastitis, hypocalcemia, digestive problems, legs and hooves problems. All diseases diagnosed until 60 DIM were grouped and analyzed as the incidence of one or two events. Culling or death until 60 DIM were grouped and also analyzed.

To determine milk composition, a milk sample was collected between 4 and 15 DIM and stored in bottles with bronopol, to further analysis by infrared and optical systems (Bentley 2000, Bentley Instruments<sup>®</sup>). Fat to protein ratio (FPR) was calculated dividing milk fat % by milk protein %; normal values are between 1.0 and 1.4. Fat to protein ratio above 1.4 is indicative of ketosis (Duffield and Bagg, 2002). In the same moment, body condition score (BCS) was evaluate on a 1 to 5 points scale, by the same person in all experimental period, according to the methodology of Wildeman et al. (1982).

In the same day, a blood sample was collected before morning milking to analyze serum BHB, aspartate aminotransferase (AST), albumin (ALB), cholesterol (CHOL), triglycerides (TG) and bilirubin (direct, indirect and total) in automatic biochemical analyzer (BS-200, Mindray, Shenzhen, China), using commercial kits. Very-low density lipoproteins (VLDL) concentration was estimated dividing TG concentration by 5



(Friedewald et al., 1972). Metabolites were categorized using average plus or minus one standard deviation, to generate three categories.

On days 5 (D5) and 10 (D10) after calving, BHB was measured using a blood drop in ketone test strips (FreeStyle Optium Ketone Monitoring System, Abbot®). Animals was categorized healthy if BHB < 1.20 mmol/L, subclinical ketotic if BHB  $\geq$  1.20 and < 2.90 mmol/L and if BHB  $\geq$  2.90 mmol/L they were categorized as clinical ketotic. Ketosis incidence was defined if an animal showed at least one BHB measurement equal or above 1.20 mmol/L (subclinical ketosis) or equal or above 2.90 mmol/L (clinical ketosis) (Duffield et al., 1998). To evaluate the effect of BHB on milk yield, BHB was also categorized in very low (< 0.70 mmol/L), intermediate ( $0.70 \leq$  BHB < 1.20 mmol/L), and high ( $\geq$  1.20 mmol/L) values.

Milk production was measured individually and daily data was recorded using the DELPRO® management software. In this study, were used cumulative milk yield in the first 30 DIM (MY30d) and the first 100 DIM (MY100d) and milk yield average in the first 30 DIM (MYA30d) and in the first 100 DIM (MYA100d). Cows moved to the hospital with some drug treatment were milked separately, milk was discarded and milk yield was not measured in these days. High MY30d and MY100d were defined when the observed production was above the average plus one standard deviation, Low MY30d and MY100d were defined when the observed production was below the average plus one standard deviation, and Intermediate MY30d MY100d when within this interval.

Before first insemination, the reproductive ability was assessed by ultrasound examinations, performed by a specialized veterinarian. Cows could be inseminated after identification of natural estrus (helped by an electronic activity identification system) or they were submitted to artificial insemination at fixed time protocols. Reproductive performance was evaluated using days to first insemination (D1AI), days to effective

insemination, also known as days open (DO), total artificial inseminations to pregnancy (TAI), pregnancy rate at first artificial insemination (P1AI), pregnancy rate at 150 DIM (P150D), and pregnancy loss after first insemination (PL1AI).

The software SAS (Statistical Analysis System, version 9.4) was used to run the statistical analysis. Pearson correlations between BHB (at D5 and D10) and other variables were estimated using PROC CORR. Adjusted means and their standard errors according class variables were calculated using PROC MIXED and differences among adjusted means were evaluated by Tukey test. To identify the factors associated with high BHB ( $\geq 1.20$  mmol/L), variables were categorized and a multilevel logistic regression model was constructed, using a backward model from the PROC LOGISTIC. Only variables with significance lower than 0.05 remained in the final model. The categories were defined according Table 1.

Least square means of D1AI, DO, and TAI according BHB classes were estimated using PROC GLM. The risk of high BHB affect P1AI, P150D and PL1AI was estimated using PROC GENMOD. In order to evaluate the impact of high BHB in incidence diseases and culling or death until 60 DIM, the PROC GLIMMIX was used. Parity order and BCS were included in the models, to adjust means. The procedure GLIMMIX from SAS was also used to analyze disease incidence according to BHB classes. Significance level was  $P \leq 0.05$ , and a trend was  $0.05 < P \leq 0.10$ .

## RESULTS AND DISCUSSION

Descriptive data about animals included in this study are shown in Table 2. Animals included in this study were 45.2% primiparous and 54.8% multiparous cows. This herd was growing, so a high proportion of primiparous was observed. Average parity order was  $2.0 \pm 1.2$ . The average daily milk yield was 32.8 and 38.2 kg/cow/day in the

first 30 and 100 DIM, respectively. Cumulative milk yield averages were 931.1 kg/cow and 3,640.6 kg/cow in the first 30 and 100 DIM, respectively.

Ketosis incidence in early lactation was 6.53% and 29.19% for clinical and subclinical ketosis, respectively, totaling 35.72% of ketotic cows, which is higher than the reported rates on previous studies (Krempaský et al., 2014; Mahrt et al., 2015). Blood BHB on D5 was lower in multiparous than primiparous ( $1.13 \pm 0.11$  mmol/L vs.  $1.26 \pm 0.12$  mmol/L;  $P < 0.05$ ), but BHB D10 did not differ ( $P > 0.10$ ) between parity classes. In this specific herd, primiparous had higher BCS than multiparous; primiparous with  $BCS \geq 4.00$  were 24.2% and only 24.5% had adequate BCS (between 3.00 and 3.25). This condition can contribute to increase lipomobilization, because high BCS in transition period is correlated with a larger drop in DMI before calving (Hayirli et al., 2002).

The hyperketonemia in early lactation is variable, but most studies have reported a range between 10% and 40% (Mcart et al., 2012; Suthar et al., 2013), corroborating with the results of present study. Animals with  $FPR \geq 1.4$  were 31.8% and 24.2% among primiparous and multiparous cows, respectively. Duffield and Bagg (2002) consider FPR a herd level tool and proposed that if a herd had 40% or more of  $FPR \geq 1.4$ , probably this herd would have a problem with subclinical ketosis. Thus, these results are close to the threshold and can be correlated with the high hyperketonemia incidence measured by ketone test strips.

Pearson correlations between BHB D5 or BHB D10 and variables are showed in Table 3. Although significant, most correlations were low; only correlations between BHB D5 and BHB D10 with serum BHB analyzed in the lab were moderate ( $r = 0.61$  and  $r = 0.65$ , respectively). Although high, these correlations could be even higher, but it is necessary to emphasize that the lab and the strips samples for BHB were not collected in the same day. Pearson correlation between BHB D5 and BHB D10 was only 0.52 ( $P <$

0.01), reinforcing the idea to measure BHB at least twice in first 15 DIM to correctly identify ketosis. McCarthy et al. (2015) showed that BHB had a weak relationship with NEFA ( $r = 0.26$ ), despite being a positive correlation. Analyzing metabolites in plasma, Li et al. (2016) found  $r = 0.55$  and  $r = 0.46$  between BHB and AST and VLDL, respectively, higher than the correlations estimated in present study. Djoković et al. (2016) found no significant correlation between BHB and AST and a significant correlation ( $r = 0.36$ ) between BHB and TG. Low correlations between BHB and the other blood metabolites reinforce the importance of evaluate the scenario more broadly, observing other blood analytes, milk yield and its composition, animal behavior, etc. in order to define how well the periparturient cow is adapted to NEB. Therefore, it is crucial to follow closely postpartum cows, mainly in first days after calving.

In Table 4 are presented metabolic profile, according BHB classes, considering total prevalence of ketosis. Ketotic cows (clinical and subclinical) had a tendency to have lower ( $P < 0.10$ ) ALB than healthy cows. Serum AST concentrations were higher ( $P < 0.10$ ) in clinically ketotic cows than subclinically ketotic and healthy ones. Animals categorized as clinically ketotic had more ( $P < 0.10$ ) direct bilirubin than the other two classes. Cholesterol, TG and VLDL did not differ ( $P > 0.10$ ) among BHB classes. These results confirm that more intense NEB impaired hepatocytis functions, wich results in acute phase proteins alterations.

Evaluating sick (with retained placenta, endometritis, or mastitis) and healthy cows, Silva Filho et al. (2017) showed that healthy cows had higher ALB at day 10 after calving. In the present study, only a trend was observed in ALB outcomes. Typically, ALB has a peak around calving time, but is relative stable in transition period.

Djoković et al. (2014) compared clinically ketotic cows with healthy ones and observed higher serum CHOL and TG concentrations in healthy cows, but in our study

no difference was identify in both metabolites. Simonov and Vlizlo (2015) investigated metabolic profile of ketotic cows around 2 and 3 weeks after calving. They observed that ketotic cows had lower glucose (1.95 vs. 2.76 mmol/L) and albumin (25.6 vs 37.0 g/L) levels and higher total bilirubin (11.8 vs. 3.1  $\mu$ mol/L) and AST (91.8 vs. 36.5 U/L) concentrations than healthy cows. Our data showed no difference between healthy and subclinically ketotic cows, but clinically ketotic cows had AST levels at least 50% higher than the other classes, indicating liver damage due to the great lipomobilization.

Analyzing plasma from cows with high or low TG accumulation in the liver at 1 week after calving, Sejersen et al. (2012) showed that cows with higher hepatic TG had more BHB (1.42 vs. 0.84 mmol/L), AST (97.0 vs. 62.3 U/L) and total bilirubin (7.0 vs 3.6  $\mu$ mol/L) than cows with lower TG in the liver. Similar results were found in the present study in cows with BHB  $\geq$  1.2 mmol/L. Kessler et al. (2014) studied hepatic gene expression and observed an increase of expression in some important enzymes of cholesterol biosynthesis, but it did not imply in an increase of VLDL or TG in the blood.

Milk yield from ketotic (clinical and subclinical) versus health cows is showed in Figure 1. Cumulative milk yield until 30d and 100d did not differ between healthy and ketotic (subclinical or clinical) cows (Figure 1A). Clinical ketosis only decreased ( $P < 0.01$ ) milk yield average until 30d, and no difference was observed between healthy and subclinically ketotic cows (Figure 1B).

But analyzing BHB differently, dividing healthy cows into very low BHB (BHB  $< 0.7$  mmol/L) and intermediate BHB ( $0.70 \text{ mmol/L} \leq \text{BHB} \leq 1.20 \text{ mmol/L}$ ), milk production did differ ( $P < 0.05$ ) among categories (Figure 2). In this analysis, 1.20 mmol/L was considerate in intermediate values. Cows with intermediate BHB D5 concentrations had higher MY30d than ketotic cows ( $945.7 \pm 20.9$  vs.  $863.1 \pm 31.0$  kg/animal, respectively), but did not differ ( $P > 0.10$ ) from cows with very low BHB D5

(906.9± 22.9 kg/animal). Animals with intermediate BHB D10 yielded more ( $P < 0.05$ ) milk in the first 30 DIM than the remaining categories (994.6±24.8 vs. 864.5±22.5 and 856.6 ±26.3 kg/animal to very low BHB and ketotic cows, respectively).

Cows with intermediate BHB concentrations and ketotic cows produced more milk (MY100d) than cows with very low BHB D5 (3,770.1±63.9 and 3,622.8±94.8 vs. 3,512.1±70.0 kg/animal, respectively), but not differ between each other. And finally, intermediate BHB D10 cows produced more milk in the first 100 DIM than cows with very low BHB or ketotic cows (3,887.2±76.1 vs. 3,537.8±68.8 and 3,480.0±80.6 kg/animal, respectively).

It is well known that specialize dairy cows pass through NEB during early lactation, precisely because they need sustain high production. If cows had a short and low intensity NEB, they can adapt without major complications (Jorristma et al., 2003). However, it seems that a cow with very low BHB is not being challenged, showing low milk production. Therefore, more productive animals will have BHB values close to the threshold of subclinical ketosis.

The final logistic regression model of risk factors to ketosis prevalence was described in Table 5. Animals with lower milk yield average in the first 100 DIM (MYA100d) had less chance to present ketosis than cows with intermediate MYA100d. In other hand, an interesting result was that cows that produce more milk in first 30d had 0.27 times less chance to have elevated BHB. This result reemphasized that healthy cows may produce more milk. Cows with FPR  $\geq 1.40$  had 3.3 times more chance to have high BHB than animals with normal FPR. Blood NEFA level can indicate the intensity of lipomobilization (Leblanc, 2010). One possible NEFA destiny is the mammary gland, where will be incorporate in milk fat. Therefore, high FPR in milk can be correlated with

excessive mobilization of adipose tissue and therefore, increased BHB levels. FPR is an inexpensive and non-invasive tool and can contribute to identify ketotic animals.

Animals that have AST concentrations higher than 111.3 U/L have 6.4 times more chance to be ketotic than cows with intermediate values of AST. High AST values can be correlated with liver damage and can be associated with high lipid accumulation in liver (Kaneko et al., 2008). A metabolism pathway of NEFA in liver is the re-esterification to TG and be exported through VLDL. Liver has limited capacity of VLDL production and TG can accumulate in hepatocytes (hepatic steatosis or fatty liver), causing injury and compromising liver function (Wankhade et al., 2017). In order to identify changes in the metabolic profile during lipomobilization, Gonz  les et al. (2011) found that ketotic cows had a mean AST value of 137.4 U/L, reinforcing our results. Thereby, these results indicate that cows with high BHB in the first days after calving may have some degree of impaired hepatic function. Indirect bilirubin can indicate hepatocytes' capacity to export elements associated with lipid metabolism. In this study, cows with lower indirect bilirubin ( $\text{Bil I} < 0.175 \text{ mg/dL}$ ) had less chance to present elevated BHB.

BHB levels affect D1AI, with healthy animals showing shorter interval to the first AI, but no difference was observed in DO or TAI (Figure 3). Others variables (P1AI, P150D and PL1AI) did not differ ( $P > 0.10$ ) between categories (Table 6). Shin et al (2015) showed no effect of BHB in pregnancy rate after first insemination. Inversely, Ospina et al. (2010) showed a decrease in the pregnancy rate at 70 DIM of cows with  $\text{BHB} \geq 10 \text{ mg/dL}$ . In the study of Valergakis et al. (2011), BHB levels in the first 3 weeks after calving had positive (undesirable) correlation with days to first AI, in accordance with present results. High NEFA and BHB levels and low glucose during NEB can negatively affect oocytes quality and uterine environment, hampering embryo deployment and gestation maintenance.

In Table 7 is shown the incidence rate of one or two diseases up to 60 DIM and culling or death up to 60 DIM according ketosis prevalence in early lactation. Only a trend was observed; 24.2% of healthy cows had one disease event versus 40.1% in clinically ketotic cows ( $P = 0.08$ ). Occurrence of two events or culling or death did not ( $P > 0.10$ ) differ between BHB classes. These results can imply that healthy and productive cows can present high BHB levels, without serious complications. Raboisson et al. (2014) founded in a meta-analysis that clinical ketosis increase 1.92 times the chance of early culling and death. In this specific herd, culling rate was low, only 3.75% up to 60 DIM. Similarly, diseases' incidence was low, only 26.95% of cows had one incidence disease until 60 DIM. In a large study, evaluating more than three thousand events, Van Dorp et al. (1999) reported 47.2% of events occurred in the first 30 days after calving, well above present results.

## CONCLUSION

Negative effects of elevated BHB levels in early lactation have been shown in previous studies in milk production. But the data shown in this study indicate that more productive cows had intermediate levels of BHB, reemphasizing the idea that high-producing cows need to undergo a slight NEB early lactation. Nevertheless, the negative effect of clinical ketosis also was identified both in milk yield as reproductive performance.

It seems that high levels of BHB in early lactation are not correlate with subsequent diseases' incidence, and this can be correlated to the ability of ruminants to use ketone bodies to generate energy. However, it was possible to identify associations between BHB and AST and bilirubin, which may help identify some degree of damage in hepatic function.



Reproductive outcomes were affected by BHB only slightly, such as days to first artificial insemination. Evaluate BHB is relatively easy and accessible to be used in commercial dairy farms, however recent data has shown that cows can have intermediate BHB circulating and to be healthy and productive.

More studies are necessary to better understand BHB role in NEB and its use by peripheral tissues and the BHB effect in. One possibility is identify others metabolites that can better explain NEB and its effects in early lactation. Milk components study is increasingly appealing, bringing more detailed information that can be used in large scale by farmers, veterinarians, and technicians.

## REFERENCES

- 333
- 334 Bisinotto, R. S., L. F. Greco, E. S. Ribeiro, N. Martinez, F. S. Lima, C. R. Staples, W. W.  
 335 Thatcher, and J.E.P. Santos. 2012. Influences of nutrition and metabolism on  
 336 fertility of dairy cows. *Anim. Reprod.* 9(3):260-272.
- 337 Chung, Y. M., M. M. Pickett, T. W. Cassidy, G. A. Varga. 2008. Effects of prepartum  
 338 dietary carbohydrate source and monensin on periparturient metabolism and  
 339 lactation in multiparous cows. *J. Dairy Sci.* 91:2744-2758.
- 340 Djoković, R., Z. Ilić, V. Kurćubić, M. P. Petrović, V. C. Petrović, B. Milošević, and I.  
 341 Omerović. 2016. Determination metabolic and nutritional status in dairy cows  
 342 during early and mid lactation. *Biotechnology in Animal Husbandry.* 32:1-8.
- 343 Djoković, R., M. Cincović, V. Kurćubić, M. Petrović, M. Lalović, B. Jašović, and Z.  
 344 Stanimirovic. 2014. Endocrine and metabolic status of dairy cows during  
 345 transition period. *Thai J. Vet. Med.* 44:59-66.
- 346 Duffield, T. F., D. Sandals, K. E. Leslie, K. Lissemore, B. W. McBride, J. H. Lumsden,  
 347 P. Dick, and R. Bagg. 1998. Efficacy of monensin for the prevention of subclinical  
 348 ketosis in lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 81:2866-2873.
- 349 Duffield, T. F., and R. Bagg. Herd level indicators for the prediction of high-risk dairy  
 350 herds for subclinical ketosis. In: *Annual Convention of the American Association*  
 351 *of Bovine Practitioners, 35, 2002, Ohio. Proceedings...* Ohio, 2002, 175-176.
- 352 Duffield, T. F., K. D. Lissemore, B. W. McBride, and K. E. Leslie. 2009. Impact of  
 353 hyperketonemia in early lactation dairy cows on health and production. *J. Dairy*  
 354 *Sci.* 92:571-580.
- 355 Esposito, G., P. C. Irons, E. C. Webb, and A. Chapwanya. 2014. Interactions between  
 356 negative energy balance, metabolic diseases, uterine health and immune response  
 357 in transition dairy cow. *Anim. Reproduction Sci.* 144:60-71.

- 358 Friedewald, W. T., R. I. Levy, D. S. Fredrickson. 1972. Estimation of the concentration  
359 of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative  
360 ultracentrifuge. Clin. Chemistry. 18:499-502.
- 361 González, F. D., R. Muiño, V. Pereira, R. Campos, and J. L. Benedito. 2011. Relationship  
362 among blood indicators of lipomobilization and hepatic function during early  
363 lactation in high-yielding dairy cows. J. Vet. Sci. 12:251-255.
- 364 Hayirli, A., R. R. Grummer, E. V. Nordheim and P. M. Crump. 2002. Animal and dietary  
365 factors affecting feed intake during the prefresh transition period in Holsteins. J.  
366 Dairy Sci. 85:3430-3443.
- 367 Jorritsma, R., T. Wensing, T. A. M. Kruip, P. L. A. M. Vos, and J. P. T. M. Noordhuizen.  
368 2003. Metabolic changes in early lactation and impaired reproductive  
369 performance in dairy cows. Vet. Res. 34:11-26.
- 370 Kaneko J. J., J. W. Harvey, and M. L. Bruss. 2008. Clinical biochemistry of domestic  
371 animal. 6<sup>th</sup> ed. Elsevier. San Diego, CA.
- 372 Krempaský, M., I. Maskaľová, L. Bujňák, and V. Vajda. 2014. Ketone bodies in blood of  
373 dairy cows: prevalence and monitoring of subclinical ketosis. Acta Vet. Brno.  
374 83:411-416.
- 375 Leblanc, S. 2010. Monitoring metabolic health of dairy cattle in the transition period. J.  
376 Reprod. Dev. 56:S29-S35.
- 377 Ling, K., A. Waldmann, J. Samarütel, H. Jaakson, T. Kaart and A. Leesmäe. 2007. Field  
378 Trial on the Relationship of Blood Metabolites and Body Condition Score with  
379 the Recurrence of Luteal Activity in Estonian Holstein Cows. J. Vet. Med. A.  
380 54:337-341.

- 381 Lukas, J. M., J. K. Reneau, R. L. Wallace, and A. De Vries. 2015. A study of methods  
382 for evaluating the success of the transition period in early-lactation dairy cows. J.  
383 Dairy Sci. 98:250-262.
- 384 Mahrt, A., O. Burfeind, and W. Heuwieser. 2015. Evaluation of hyperketonemia risk  
385 period and screening protocols for early-lactation dairy cows. J. Dairy Sci.  
386 98:3110-3119.
- 387 McArt, J. A. A., D. V. Nydam, and G. R Oetzel. 2013. Epidemiology of subclinical  
388 ketosis in early lactation dairy cattle. J. Dairy Sci. 95:5056-5066.
- 389 McArt, J. A. A., D. V. Nydam, and M. W. Overton. 2015. Hyperketonemia in early  
390 lactation dairy cattle: a deterministic estimate of component and total cost per  
391 case. J. Dairy Sci. 98:2043-2054.
- 392 McCarthy, M. M., S. Mann, D. V. Nydam, T. R. Overton, and J. A. A. McArt. 2015.  
393 Short communication: Concentrations of nonesterified fatty acids and  $\beta$ -  
394 hydroxybutyrate in dairy cows are not well correlated during the transition period.  
395 J. Dairy Sci. 98:6284-6290.
- 396 National Research Council. 2001. Nutrient Requirements of Dairy Cattle. 7th rev. ed.  
397 Natl. Acad. Press, Washington, DC.
- 398 Ospina, P. A., D. V. Nydam, T. Stokol, and T. R. Overton. 2010. Associations of elevated  
399 nonesterified fatty acids and  $\beta$ -hydroxybutyrate concentrations with early  
400 lactation reproductive performance and milk production in transition dairy cattle  
401 in the northeastern United States. J. Dairy Sci. 93:1596-1603.
- 402 Santschi, D. E. et al. 2016. Prevalence of elevated milk  $\beta$ -hydroxybutyrate concentrations  
403 in Holstein cows measured by Fourier-transform infrared analysis in Dairy Herd  
404 Improvement milk samples and association with milk yield and components. J.  
405 Dairy Sci. 99:9263-9270.

- 406 Sejersen, H., M. T. Sørensen, T. Larsen, E. Bendixen, and K. L. Ingvarsten. 2012. Liver  
 407 protein expression in dairy cows with high liver triglycerides in early lactation. *J.*  
 408 *Dairy Sci.* 95:2409-2421.
- 409 Shin, E. K., J. K. Jeong, I. S. Choi, H. G. Kang, T. Y. Hur, Y. H. Jung, and I. H. Kim.  
 410 2015. Relationships among ketosis, serum metabolites, body condition, and  
 411 reproductive outcomes in dairy cattle. *Theriogenology* 84:252-260.
- 412 Simonov, M., and V. Vlizlo. 2015. Some blood markers of the functional state of liver in  
 413 dairy cows with clinical ketosis. *Bulg. J. Vet. Med.* 18:74-82.
- 414 Suthar, V. S., J. Canelas-Raposo, A. Deniz, and W. Heuwieser. 2013. Prevalence of  
 415 subclinical ketosis and relationships with postpartum diseases in European dairy  
 416 cows. *J. Dairy Sci.* 96:2925-2938.
- 417 Valergakis, G. E., G. Oikonomou, G. Arsenos, and G. Banos. 2011. Phenotypic  
 418 association between energy balance indicators and reproductive performance in  
 419 primiparous Holstein cows. *Vet. Rec.* 19:168-189.
- 420 van Dorp, R. T. E., S. W. Martin, M. M. Shoukri, J. P.T.M. Noordhuizen, and J. C.M.  
 421 Dekkers. 1999. An epidemiologic study of disease in 32 registered Holstein dairy  
 422 herds in British Columbia. *Can. J. Vet. Research* 63:185-192.
- 423 Wankhade, P. R., A. Manimaran, A. Kumaresan, S. Jeyakumar, K. P. Ramesha, V. Sejian,  
 424 D. Rajendran, and M. R. Varghese. 2017. Metabolic and immunological changes  
 425 in transition dairy cows: A review. *Veterinary World.* 10:1367-1377.
- 426 Wittwer, F. 2000. Diagnóstico dos desequilíbrios metabólicos de energia em rebanhos  
 427 bovinos. In: González, F. H. D., J. O. Barcelos, H. Ospina, L. A. O. Ribeiro (Eds).  
 428 Perfil metabólico em ruminantes: seu uso em nutrição e doenças nutricionais.  
 429 Porto Alegre, Brasil, Gráfica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
- 430

## Tables and Figures

**Table 1.** Variables included in examination of risk factors for ketosis prevalence in early lactation cows.

Variable	Categories	
	Primiparous	Multiparous
Parity order	1	≥ 2
MYA100d (Kg/cow/day)	< 29.4	< 31.7
	≥ 29.4 and < 40.8	≥ 31.7 and < 51.1
	≥ 40.8	≥ 51.1
MYA30d (Kg/cow/day)	< 23.0	< 26.7
	≥ 23.0 and < 34.4	≥ 26.7 and < 45.5
	≥ 34.4	≥ 45.5
MY100d (Kg/cow)	< 2,487.1	> 2,741.2
	≥ 2,487.1 and < 4,099.7	≥ 2,741.2 and < 5,112.8
	≥ 4,099.7	≥ 5,112.8
MY30d (Kg/cow)	< 517.6	< 637.6
	≥ 517.6 and < 1,059.8	≥ 637.6 and < 1,393.8
	≥ 1,059.8	≥ 1,393.8
BCS (points)	< 3.00	
	3.00 ≤ BCS ≤ 3.50	
	≥ 3.75	
FPR	< 1.00	
	1.00 ≤ FPR ≤ 1.40	
	> 1.40	
AST (U/L)	> 41.3	
	41.3 ≤ AST < 111.3	
	≥ 111.3	
ALB (g/dL)	< 3.0	
	3.0 ≤ ALB < 3.8	
	≥ 3.8	
CHOL (mg/dL)	< 44	
	44 ≤ CHOL < 96.4	
	≥ 96.4	
TG (mg/dL)	< 6.4	
	6.4 ≤ TG < 11.0	
	≥ 11.0	
VLDL (mg/dL)	< 0.98	
	0.98 ≤ VLDL < 2.54	
	≥ 2.54	
Bil D (mg/dL)	< 0.049	
	0.049 ≤ Bil D < 0.137	
	≥ 0.137	
Bil I (mg/dL)	< 0.175	
	0.175 ≤ Bil I < 0.334	
	≥ 0.334	
Bil T (mg/dL)	< 0.049	
	0.049 ≤ Bil T < 0.463	
	≥ 0.463	

**Table 2.** Descriptive data (means and standard deviation) of cows included in the study, according to parity order.

Variable	Primiparous (n=314)	Multiparous (n=380)
Age at calving (mo)	24.1 ( $\pm$ 2.3)	50.7 ( $\pm$ 18.5)
MYA30d <sup>1</sup> (L/cow/d)	28.7 ( $\pm$ 5.7)	36.1 ( $\pm$ 9.4)
MYA100d <sup>2</sup> (L/cow/d)	35.1 ( $\pm$ 5.7)	41.4 ( $\pm$ 9.7)
MY30d <sup>3</sup> (L/cow)	788.7 ( $\pm$ 271.1)	1,015.7 ( $\pm$ 378.1)
MY100d <sup>4</sup> (L/cow)	3,293.4 ( $\pm$ 806.3)	3,927.0 ( $\pm$ 1,185.8)
BHB D5 <sup>5</sup> (mmol/L)	1.13 ( $\pm$ 0.86)	0.96 ( $\pm$ 0.64)
BHB D10 <sup>6</sup> (mmol/L)	1.22 ( $\pm$ 1.01)	1.08 ( $\pm$ 0.80)
DIM <sup>7</sup> (d)	8.1 ( $\pm$ 2.2)	8.2 ( $\pm$ 2.3)
BCS <sup>8</sup> (points)	3.53 ( $\pm$ 0.55)	3.10 ( $\pm$ 0.60)
Milk fat (%) <sup>9</sup>	4.70 ( $\pm$ 1.06)	4.45 ( $\pm$ 1.11)
Milk protein (%) <sup>10</sup>	3.58 ( $\pm$ 0.44)	3.60 ( $\pm$ 0.43)
FPR <sup>11</sup>	1.34 ( $\pm$ 0.39)	1.26 ( $\pm$ 0.40)
AST <sup>12</sup> (U/L)	72.5 ( $\pm$ 27.2)	79.4 ( $\pm$ 40.2)
ALB <sup>13</sup> (g/dL)	3.27 ( $\pm$ 0.38)	3.42 ( $\pm$ 0.39)
CHOL <sup>14</sup> (mg/dL)	73.4 ( $\pm$ 27.1)	67.7 ( $\pm$ 25.2)
TG <sup>15</sup> (mg/dL)	9.2 ( $\pm$ 2.1)	8.3 ( $\pm$ 2.4)
VLDL <sup>16</sup> (mg/dL)	1.89 ( $\pm$ 1.03)	1.66 ( $\pm$ 0.47)
BHB L <sup>17</sup> (mmol/L)	1.06 ( $\pm$ 0.87)	0.93 ( $\pm$ 0.72)
Bil D <sup>18</sup> (mg/dL)	0.082 ( $\pm$ 0.035)	0.084 ( $\pm$ 0.050)
Bil I <sup>19</sup> (mg/dL)	0.162 ( $\pm$ 0.118)	0.184 ( $\pm$ 0.211)
Bil T <sup>20</sup> (mg/dL)	0.243 ( $\pm$ 0.147)	0.264 ( $\pm$ 0.239)

<sup>1</sup>Milk yield average in first 30 DIM; <sup>2</sup>Milk yield average in first 100 DIM <sup>3</sup>Cumulative milk yield in first 30 days; <sup>4</sup>Cumulative milk yield in first 100 days; <sup>5</sup> $\beta$ -hydroxybutyrate at day 5 after calving; <sup>6</sup> $\beta$ -hydroxybutyrate at day 10 after calving; <sup>7</sup>Days in milk; <sup>8</sup>Body condition score; <sup>9</sup>Milk fat percentage; <sup>10</sup>Milk protein percentage; <sup>11</sup>Fat to protein ratio; <sup>12</sup>Aspartate aminotransferase; <sup>13</sup>Albumin; <sup>14</sup>Cholesterol; <sup>15</sup>Triglycerides; <sup>16</sup>Very low density lipoprotein; <sup>17</sup>Laboratorial  $\beta$ -hydroxybutyrate; <sup>18</sup>Direct bilirubin; <sup>19</sup>Indirect bilirubin; <sup>20</sup>Total bilirubin.

**Table 3.** Pearson correlations between  $\beta$ -hydroxybutyrate in day 5 (BHB D5) or day 10 (BHB D10) and other variables.

Variable	BHB D5 (mmol/L)	BHB D10 (mmol/L)
Age at calving (months)	0.02	0.07 <sup>†</sup>
Parity order	-0.02	0.02
MYA30d <sup>1</sup> (L/cow/day)	-0.09	-0.03
MYA100d <sup>2</sup> (L/cow/day)	-0.04	0.01
MY30d <sup>3</sup> (L/cow)	-0.11 <sup>**</sup>	-0.10 <sup>*</sup>
MY100d <sup>4</sup> (L/cow)	-0.06	-0.04
BCS <sup>5</sup> (points)	0.11 <sup>**</sup>	0.14 <sup>***</sup>
Milk fat (%)	0.33 <sup>***</sup>	0.29 <sup>***</sup>
Milk protein (%)	-0.25 <sup>***</sup>	-0.20 <sup>***</sup>
FPR <sup>6</sup>	0.38 <sup>***</sup>	0.31 <sup>***</sup>
AST <sup>7</sup> (U/L)	0.32 <sup>***</sup>	0.37 <sup>***</sup>
ALB <sup>8</sup> (g/dL)	-0.10 <sup>*</sup>	0.03
CHOL <sup>9</sup> (mg/dL)	-0.20 <sup>***</sup>	-0.09 <sup>*</sup>
TG <sup>10</sup> (mg/dL)	0.14 <sup>***</sup>	0.03
VLDL <sup>11</sup> (mg/dL)	0.11 <sup>*</sup>	0.04
BHB Lab <sup>12</sup> (mmol/L)	0.61 <sup>***</sup>	0.65 <sup>***</sup>
Bil D <sup>13</sup> (mg/dL)	0.32 <sup>***</sup>	0.20 <sup>***</sup>
Bil T <sup>14</sup> (mg/dL)	0.32 <sup>***</sup>	0.28 <sup>***</sup>
Bil I <sup>15</sup> (mg/dL)	0.29 <sup>***</sup>	0.27 <sup>***</sup>

<sup>1</sup>Milk yield average in first 30 days; <sup>2</sup>Milk yield average in first 30 days; <sup>3</sup>Cumulative milk yield in first 30days; <sup>4</sup>Cumulative milk yield in first 100 days; <sup>5</sup>Body condition score; <sup>6</sup>Fat to protein ratio; <sup>7</sup>Aspartate aminotransferase; <sup>8</sup>Albumin; <sup>9</sup>Cholesterol; <sup>10</sup>Triglycerides; <sup>11</sup>Very low density lipoprotein; <sup>12</sup>Laboratorial  $\beta$ -hydroxybutyrate; <sup>13</sup>Direct bilirubin; <sup>14</sup>Total bilirubin; <sup>15</sup>Indirect bilirubin.

<sup>†</sup> $P < 0.10$ ;  $^*P < 0.05$ ;  $^{**}P < 0.01$ ;  $^{***}P < 0.001$ .



**Table 4.** Least square means and standard errors of metabolic profile, according BHB (mmol/L) categories.

	Healthy <sup>1</sup>	Subclinical ketosis <sup>2</sup>	Clinical ketosis <sup>3</sup>
Albumin (g/dL)	3.49 (±0.11) <sup>a</sup>	3.34 (±0.08) <sup>b†</sup>	3.27 (±0.09) <sup>ab</sup>
AST (U/L)	75.46 (±9.10) <sup>b***</sup>	68.35 (±7.06) <sup>b**</sup>	115.89 (±9.69) <sup>a</sup>
Cholesterol (mg/dL)	68.82 (±7.10) <sup>a</sup>	67.29 (±5.48) <sup>a</sup>	59.21 (±6.05) <sup>a</sup>
Triglycerides (mg/dL)	8.28 (±0.66) <sup>a</sup>	8.56 (±0.51) <sup>a</sup>	9.82 (±0.70) <sup>a</sup>
VLDL (mg/dL)	1.88 (±0.23) <sup>a</sup>	1.74 (±0.18) <sup>a</sup>	1.88 (±0.20) <sup>a</sup>
Direct Bilirubin (mg/dL)	0.069 (±0.014) <sup>b*</sup>	0.084 (±0.011) <sup>b†</sup>	0.117 (±0.013) <sup>a</sup>
Indirect Bilirubin (mg/dL)	0.174 (±0.078) <sup>a</sup>	0.137 (±0.064) <sup>a</sup>	0.313 (±0.077) <sup>a</sup>
Total Bilirubin (mg/dL)	0.202 (±0.058) <sup>a</sup>	0.160 (±0.043) <sup>b†</sup>	0.289 (±0.050) <sup>a</sup>

<sup>1</sup>BHB < 1.20 mmol/L; <sup>2</sup>1.20 mmol/L ≤ BHB < 2.90 mmol/L; <sup>3</sup>BHB ≥ 2.90 mmol/L.

<sup>a,b</sup>Means within a row with different superscripts differ. <sup>†</sup> $P < 0.10$ ; <sup>\*</sup> $P < 0.05$ ; <sup>\*\*</sup> $P < 0.01$ ; <sup>\*\*\*</sup> $P < 0.001$ .

**Table 5.** Final logistic regression model of factors associated with ketosis prevalence (blood BHB  $\geq 1.20$  mmol/L) in early lactation cows in a commercial dairy herd in Southern Brazil.

Variable	Estimate	SE	Odds ratio	95% CI
<b>MYA100d<sup>1</sup> (kg/d)</b>				
Low	-1.39	0.54	0.25*	0.08 to 0.72
Intermediate			Reference	
High	0.69	0.45	1.99	0.82 to 4.84
<b>MY30d<sup>2</sup> (kg)</b>				
Low	0.61	0.40	1.83	0.84 to 4.00
Intermediate			Reference	
High	-1.30	0.60	0.27*	0.08 to 0.88
<b>Fat to Protein Ratio</b>				
< 1.00	-1.30	0.49	0.27**	0.11 to 0.71
1.00 $\leq$ FPR $\leq$ 1.40			Reference	
> 1.40	1.19	0.33	3.28***	1.71 to 6.27
<b>Aspartate aminotransferase (AST; U/L)</b>				
> 41.3	-0.11	0.64	0.89	0.26 to 3.10
41.3 $\leq$ AST < 111.3			Reference	
$\geq 111.3$	1.85	0.71	6.37**	1.58 to 25.69
<b>Indirect Bilirubin (Bil I; mg/dL)</b>				
< 0.175	-1.71	0.37	0.18***	0.08 to 0.37
0.175 $\leq$ Bil I < 0.334			Reference	
$\geq 0.334$	-0.12	0.68	0.88	0.24 to 3.33

<sup>1</sup>Milk yield average in the first 100 DIM, adjusted to parity order; for primiparous – low: < 29.4 kg/d; intermediate:  $\geq 29.4$  and < 40.8 kg/d and high:  $\geq 40.8$  kg/d, for multiparous – low: < 31.7 kg/d; intermediate:  $\geq 31.7$  and < 51.1 kg/d; high:  $\geq 51.1$  kg/d. <sup>2</sup>Cumulative milk yield in the first 30 DIM, adjusted to parity order; for primiparous – low: < 517.6 kg; intermediate:  $\geq 517.6$  and < 1,059.8 kg; high:  $\geq 1,059.8$  kg.

\* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ ; \*\*\* $P < 0.001$ .

**Table 6.** Risk of  $\beta$ -hydroxybutyrate (BHB) levels affect pregnancy at first artificial insemination after calving, pregnancy at 150 days in milk (DIM) and pregnancy loss after first artificial insemination.

BHB class	% positive result	Adjusted OR (95% CI)	<i>P</i>
Pregnancy at first AI			
BHB D5			
< 1.20 mmol/L	19.6	0.79 (0.50 to 1.26)	0.33
$\geq$ 1.20 mmol/L	23.4	Reference	
BHB D10			
< 1.20 mmol/L	22.4	1.12 (0.71 to 1.74)	0.63
$\geq$ 1.20 mmol/L	20.5	Reference	
Pregnancy at 150 DIM			
BHB D5			
< 1.20 mmol/L	58.7	1.32 (0.86 to 2.02)	0.20
$\geq$ 1.20 mmol/L	51.9	Reference	
BHB D10			
< 1.20 mmol/L	55.5	1.01 (0.68 to 1.50)	0.95
$\geq$ 1.20 mmol/L	55.2	Reference	
Pregnancy loss at first IA			
BHB D5			
< 1.20 mmol/L	9.4	0.66 (0.37 to 1.19)	0.17
$\geq$ 1.20 mmol/L	13.6	Reference	
BHB D10			
< 1.20 mmol/L	12.1	1.17 (0.65 to 2.10)	0.61
$\geq$ 1.20 mmol/L	10.6	Reference	

477 **Table 7.** Risk occurrence of one or two diseases and culling or death up to 60 DIM,  
 478 according to ketosis incidence in early lactation.

	Means (SD)	95% CI
<b>One disease</b>		
Health	24.2% ( $\pm 2.4$ ) <sup>b†</sup>	20.0% to 28.9%
Subclinical ketosis	26.9% ( $\pm 2.9$ ) <sup>a</sup>	21.5% to 33.0%
Clinical ketosis	40.1% ( $\pm 7.6$ ) <sup>a</sup>	26.4% to 55.6%
<b>Two diseases</b>		
Health	7.9% ( $\pm 1.4$ ) <sup>a</sup>	5.5% to 11.2%
Subclinical ketosis	7.6% ( $\pm 1.7$ ) <sup>a</sup>	4.8% to 11.8%
Clinical ketosis	4.3% ( $\pm 3.0$ ) <sup>a</sup>	1.1% to 15.6%
<b>Culling or death</b>		
Health	2.4% ( $\pm 0.8$ ) <sup>a</sup>	1.2% to 4.7%
Subclinical ketosis	2.9% ( $\pm 1.1$ ) <sup>a</sup>	1.4% to 6.1%
Clinical ketosis	5.2% ( $\pm 3.7$ ) <sup>a</sup>	1.3% to 19.0%

479 <sup>†</sup> $P < 0.10$ .

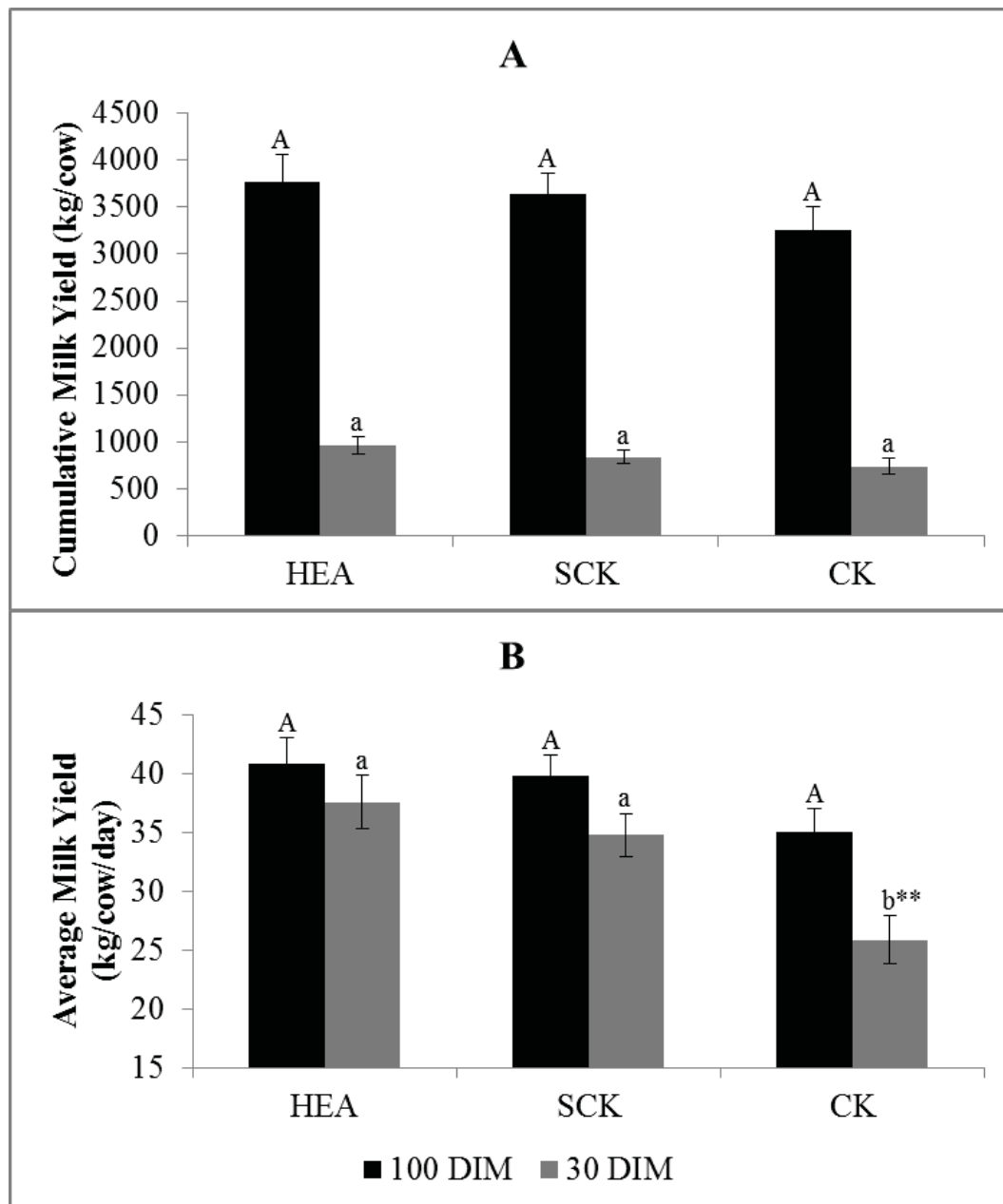


Figure 1. Cumulative milk yield (A) or average milk yield (B) in the first 30 or 100 days in milk of healthy cows (HEA; BHB < 1.20 mmol/L), subclinical ketosis (SCK; 1.20 mmol/L ≤ BHB < 2.90 mmol/L) and clinical ketosis cows (CK; BHB ≥ 2.90 mmol/L). Bars with different letters are statistically different. <sup>†</sup>*P* < 0.10; \**P* < 0.05; \*\**P* < 0.01; \*\*\**P* < 0.001.

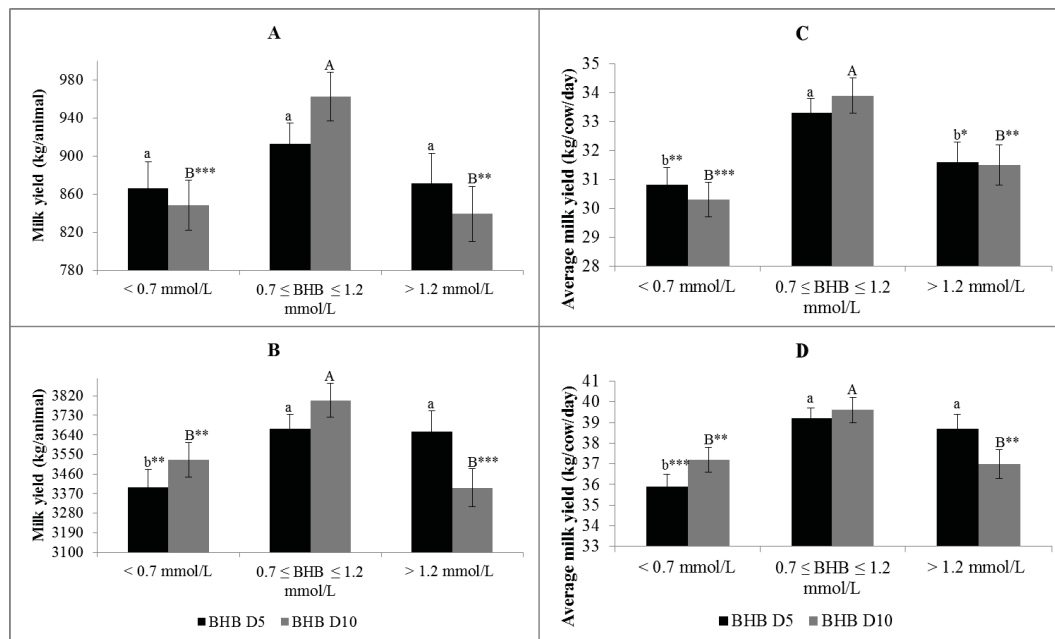


Figure 2. Cumulative milk yield in first 30 (A) or 100 (B) days in milk and milk yield average in first 30 DIM (C) or first 100 DIM (D), according BHB class in day 5 (BHB D5) or day 10 (BHB D10) after calving. Bars with different letters are statistically different. <sup>†</sup> $P < 0.10$ ; \* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ ; \*\*\* $P < 0.001$ .

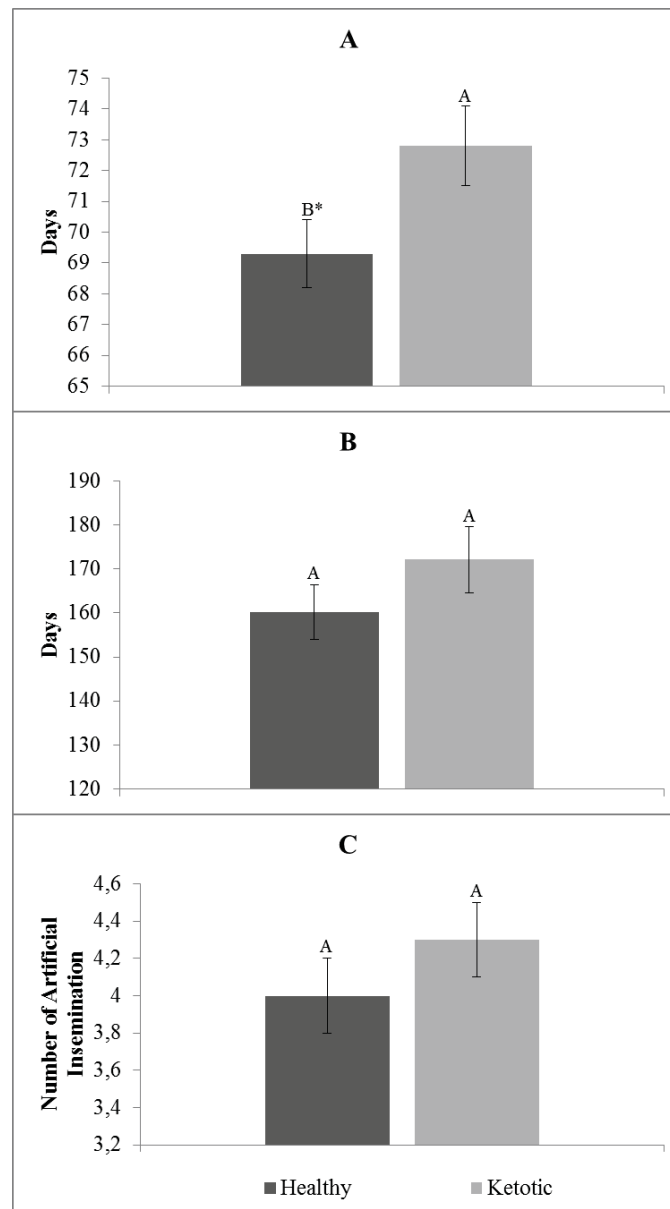


Figure 3. Days to first insemination after calving (A), days open (B) and number of artificial inseminations for pregnancy (C), according ketosis prevalence in early lactation. Bars with different letters are statistically different.  $^{\dagger}P < 0.10$ ;  $*P < 0.05$ ;  $**P < 0.01$ ;  $***P < 0.001$ .

# **CAPÍTULO III – MILK FATTY ACIDS PROFILE IN EARLY LACTATION AND ASSOCIATIONS WITH PRODUCTION, REPRODUCTION AND HEALTH**

Fatty acids profile in early lactation

## **Milk fatty acids profile in early lactation and associations with production, reproduction and health**

**J. K. Poncheki<sup>\*</sup>, D. P. D. Lanna<sup>†</sup>, G. T. Santos<sup>‡</sup>, R. de Almeida<sup>\*1</sup>**

<sup>\*</sup>Programa de Pós-graduação em Zootecnia, Universidade Federal do Paraná - UFPR,

<sup>†</sup>Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo -

ESALQ/USP, <sup>‡</sup> Programa de Pós-graduação em Zootecnia, Universidade Estadual de

Maringá - UEM.

<sup>1</sup>Corresponding author: ralmeida@ufpr.br

**Milk fatty acids profile in early lactation and associations with production, reproduction and health. Poncheki et al.** Negative energy balance is physiological in early lactation dairy cows. Milk composition can reflect blood components and indicate some disorders. Ketotic cows have synthesis de novo impaired in early lactation. Fatty acids associated with lipomobilization, like *cis*-9 C18:1, can negatively affect reproductive performance and odd-chain fatty acids, like C13:0, C15:0 and C17:0 can be correlated with subsequent milk yield and culling or death.



## ABSTRACT

The aim was to evaluate milk fatty acids (FA) profile in early lactation and correlated with milk yield, health and reproduction in Holstein cows. A hundred ninety cows (one third of healthy and two third of ketotic) were chosen from originally 694 animals, calving between Sep/2015 to Aug/2016 in Southern Brazil. Milk FA profile was evaluated by gas chromatography, between 4 and 15 after calving. FA were grouped according saturation number and carbon chain size. Blood serum was used to analyze metabolic profile. BHB was measured using ketone test strips in day 5 and 10. Subclinical ketosis was considerate if BHB  $\geq 1.20$  mmol/L and clinical ketosis if BHB  $> 2.9$  mmol/L. Prevalence ketosis was the percentage of animals that present high BHB in D5 or D10. Productive outcomes were cumulative milk yield in first 30 and 100 DIM (MY30d; MY100d) and daily milk yield average in first 30 and 100 DIM (MYA30d; MYA100d). Reproductive performance was evaluated using days to first insemination (D1AI), days open (DO), total AI to pregnancy (TAI), pregnancy at first AI (P1AI), pregnancy at 150 DIM (P150D), and pregnancy loss after first insemination (PL1AI). Diseases incidence and culling or death were assessed until 60 DIM. To statistical analyzes, PROC CORR, MEANS, MIXED and LOGISTIC of SAS software were used and ROC curve of FA with ketosis, incidence of one diseases and culling or death was calculated with MedCalc software. Three FA represented more than 71% of milk fat: *c9* C18:1 (27.5%), C16:0 (26.8%) and C18:0 (17.1%). The strongest correlation observed with BHB was *c9* C18:1 (0.62 and 0.59 with BHB5 and BHB10, respectively). Healthy cows had more C4:0 to C14:0 than ketotic cows and C13:0 had higher AUC to identify ketosis with associated criterion  $C13:0 \leq 0.049$  g/100g. Some FA ratios (C17:0/C15:0, *cis*-9 C16:1/C15:0) was associated to low productive performance. Only P150d was influenced by FA profile; cows with *c9* C18:1  $> 33.607$  g/100g had 13.4 more likelihood to have reproductive

failure at 150 DIM than animals with lower values. Better FA to identify diseases incidence was *t16* C18:1 with AUC = 0.68 ( $\pm 0.05$ ) and C15:0 (variations or ratios) showed higher AUC to identify culling or death until 60 DIM. These results indicate that many milk FA and FA ratio in early lactation are an efficient tool to evaluate effects of negative energy balance in transition period of Holstein cows.

Key words: oleic acid, culling, milk fat composition, metabolic profile, transition period.

## INTRODUCTION

In early lactation, negative energy balance (NEB) is a physiological condition in dairy cattle, but if NEB is very intense or long, cows can develop metabolic problems and it can have negative effects in productivity, reproductive performance and health (Duffield et al., 2009; Ceciliani et al., 2018). Diseases related with energy metabolism in early lactation have a negative impact in economic results of a dairy farm, mainly because of worst reproduction, future milk production loss and death or involuntary culling (Mcart et al., 2015). The major problem is subclinical diseases that cannot clearly be identified, but can reduce significantly milk production, reproductive success and compromises immune system (Mcart et al., 2013; Suthar et al., 2013).

Therefore, is important to monitor management and animals in first few days after calving, to identify cows with more challenge, which may develop problems related to NEB (Lukas et al., 2015). Advances in milk composition analyzes have made possible use molecules to identify early changes in some metabolic pathways. Infrared analyzes have made milk analysis more accessible and faster, helping famers to evaluated management.

Fat is the most variable component of dairy milk and more than 400 fatty acids (FA) have been found in milk. Milk fat composition is a result of synthesis *de novo* in mammary gland, FA coming from diet and pre-formed FA from blood (Stoop et al., 2009). Many variables can affect FA profile, like herd, production systems, nutritional management, sanity and even individual characteristics (Mele et al., 2016).

Some FA have particular interest and relevance to human health, because of anticarcinogenic, antidiabetic, antiatherogenic and immune system stimulant effects, mainly specific CLA isomers (Movaliya et al., 2014). Others FA, particularly long chain FA, are related with increase in blood NEFA and incidence of diseases in early lactation cows, like ketosis and abomasum displacement (Van Haelst et al., 2008; Hostens et al., 2012; Jorjong et al., 2014). During NEB, the most mobilized FA of adipose tissue is *cis*-9 C18:1 (oleic acid) and can compose a large part of milk fat in early lactation (Adewuyi et al., 2005; Bilal et al., 2014).

Bastin et al. (2016) explained that FA profile in early lactation changes because modification in two ways of obtaining FA, blood supply and synthesis *de novo* in mammary gland. Lipomobilization increase NEFA levels in plasma, they are target to mammary gland and can be used to milk fat composition. Therefore, is expected that cows in early lactation have more long chain fatty acids (LCFA) in milk. High levels of NEFA have a negative feedback effect in synthesis *de novo* of FA in mammary gland. Martin et al. (2015) founded difference in C14:0, C16:0 and *cis*-9 C18:1 in cows that present early luteal activity. These results indicate that this FA can be used to identify cows with better reproductive responses.

The objective of this study was to evaluate milk FA profile in early lactation of healthy and ketotic cows and identify specific FA or FA ratios in milk in first days after

calving that can be correlated with milk production, health, culling or death and reproduction in Holstein dairy cows.

## MATERIAL AND METHODS

All animal procedures were approved by the Animal Care and Use Committee from Paraná State Federal University (CEUA-UFPR), under protocol number 064/2016. The study was conducted in commercial dairy herd located in Palmeira County, Paraná State, Southern Brazil. Initially, data was collect from 694 Holstein cows (314 primiparous and 380 multiparous) calving between September 2015 to August 2016. Of these cows, 190 were chosen (95 primiparous and 95 multiparous) being one third of healthy and two third of ketotic cows. Cows were confined in free-stall system, and milked three times per day. They were moved from the far-off to the close-up group 25-30 days before the expected calving date, so these cows were supplemented with a anionic diet for at least 21 days before calving. After calving, cows were kept in the fresh group for a period ranging from 15 to 30 days.

This group was monitored daily, via clinical examination done by a veterinarian and with assistance of a rumination monitoring system (SCR, Allflex Livestock Intelligence<sup>®</sup>, USA), to identify possible diseases. All diseases and culling or death occurrence were recorded using DELPRO<sup>®</sup> (DeLaval Inc, Missouri, USA). Cows with diseases were moved to “hospital lot”, to receive treatment and intensive care. Diseases identified in early lactation were: retained placenta, metritis, uterus adherence, cervicitis, uterine discharge, displacement of abomasum, diarrhea, fever, mastitis, hypocalcemia, digestive problems, legs and hooves problems. All diseases diagnosed until 60 DIM were

grouped and analyzed as the incidence of one or two events. Culling or death until 60 DIM were grouped and also analyzed.

To determine milk composition, a milk sample was collected between 4 and 15 DIM and stored in bottles with bronopol, to further analysis by infrared and optical systems (Bentley 2000, Bentley Instruments®). Fat to protein ratio (FPR) was calculated dividing milk fat % by milk protein %; normal values are between 1.0 and 1.4. Fat to protein ratio above 1.4 is indicative of ketosis (Duffield and Bagg, 2002). Body condition score (BCS) was evaluate on a 1 to 5 points scale, by the same person in all experimental period (Wildeman et al., 1982).

To analyze FA profile, milk sample of the same collect was frozen without any chemical preservative to further analysis by gas chromatography (Finnigan Focus CG, Thermo Fisher Scientific™). Milk fat was extract using procedure described by Hara and Randin (1978). After fat extraction, samples were methylated (Christie, 1982) and 1 µL of esterified extract was injected in a capillary column, with 100 m length by 0.25 µm of internal diameter and 0.20 µm film thickness. Identification of 52 FA was made by retention time comparison and to determine percentage of each FA Chromquest 4.1 (Thermo Electron, Italy) software was used. The comparison was made using butter fatty acids profile. Fatty acids were individually analyzed or grouped according saturations number in saturated fatty acids (with no unsaturation) – SFA; monounsaturated fatty acids (with one unsaturation) – MUFA; or polyunsaturated fatty acids (with two or more unsaturation) – PUFA. Fatty acids were also grouped according size of carbonic chain in short chain fatty acids (C4 to C10) – SCFA; medium chain fatty acids (C11 to C16) – MCFA; and long chain fatty acids (C17 or more) – LCFA.

A blood sample was collected before morning milking to analyze serum BHB, aspartate aminotransferase (AST), albumin (ALB), cholesterol (CHOL), triglycerides

(TG) and bilirubin (direct, indirect and total) in automatic biochemical analyzer (BS-200, Mindray, Shenzhen, China), using commercial kit tests. VLDL concentration was estimated dividing TG concentration by 5 (Friedewald et al., 1972). On day 5 (D5) and day 10 (D10) after calving, BHB was measured using a blood drop in ketone test strips (FreeStyle Optium Ketone Monitoring System, Abbot®). Animals were categorized with subclinical ketosis if BHB  $\geq$  1.20 mmol/L or clinical ketosis if BHB  $>$  2.9 mmol/L (Duffield et al., 1998) and prevalence ketosis was calculated by percentage of animals that present high BHB in D5 or D10.

Milk production was measured individually and data was recorded using the DELPRO® management software. In this study, cumulative milk yield in first 30 DIM (MY30d) and first 100 DIM (MY100d) and daily milk yield average in first 30 DIM (MYA30d) and in first 100 DIM (MYA100d) were analyzed. Cows with some drug treatment were milked separately, milk was discarded and milk production wasn't measured in those days.

Before first insemination, the ability to reproduce was assessed by ultrasound examinations performed by a specialized veterinarian. Cows could be inseminated after identification of natural estrus (by electronic activity identification system) or cows were submitted to artificial insemination at fixed time protocols. Reproductive performance was evaluated using days to first insemination (D1AI), days open (DO), total artificial inseminations to pregnancy (TAI), pregnancy at first artificial insemination (P1AI), pregnancy at 150 DIM (P150D), and pregnancy loss after first insemination (PL1AI).

To statistical analysis, the software SAS (Statistical Analysis System, version 9.4) was used. Means according parity order were calculated using PROC MEANS and Pearson correlations between fatty acids and other variables were calculated using PROC

CORR. Fatty acids adjusted means according ketosis prevalence were calculated using PROC MIXED, adjusted for BCS and parity order; means difference were evaluated by Tukey test.

Milk yield outcomes were analyzed using PROC LOGISTIC to identify risk factors associated with FA profile and low productive performance. For this, FA was categorized according Table 1 and low productive performance was considerate below average (to MY30d, MY100d, MYA30d and MYA100d), according parity order. To analyze effects of FA in reproduction outcomes, Pearson correlation between FA and DO, D1AI and TAI was calculated using PROC CORR and adjusted means was analyzed using PROC GLM. Risk factors associated with low reproductive performance (P1AI, P150D and PL1AI) were evaluated using PROC LOGISTIC (variable classes in Table 1).

To analyze sensitivity and specificity of FA to identify early ketosis or incidence of one disease in first 60 DIM, MedCalc® (Version 18.11.3) software was used and ROC Curve was calculated of each fat acid with prevalence ketosis and incidence of one disease until 60DIM.

## RESULTS AND DISCUSSION

Descriptive data about animals included in this study, according parity order, are present in Table 2. Primiparous produce less milk (MYA30d, MYA100d, MY30d and MY100d) than multiparous, as well defined (NRC, 2001). Because milk samples were chosen from ketotic cows, in most, BHB5 and BHB10 average were above 1.20mmol/L. In this specific herd, primiparous had high BCS and this condition can contribute to elevated lipomobilization, because high BCS in transition period is correlated with a

larger drop in DMI (Hayirli et al., 2002), and can explain higher BHB in primiparous cows of our data.

Considering original data (694 cows), animals with ketosis (in day 5 or day 10) were 40.6% in this study. The hyperketonemia prevalence ( $\text{BHB} \geq 1.20 \text{ mmol/L}$ ) in early lactation is variable, but many studies have reported a range between 10% and 40% (Mcart et al., 2013; Suthar et al., 2013), corroborating with results of present study.

Fat to protein ratio was close to 1.4, also explained because of chosen ketotic cows. Duffield and Bagg (2002) indicate use the cut point of 1.40: if a herd had 40% or more of cows in early lactation with  $\text{FPR} \geq 1.4$ , probably had a problem with subclinical ketosis. Thus, these results are close to threshold and can be correlated with the high hyperketonemia incidence measured by ketone test strips.

In Table 3 was described milk FA composition of cows between 4 and 15 DIM. Three FA represented more than 71% of milk fat: *cis-9* C18:1 (27.54%), C16:0 (26.82%) and C18:0 (17.13%). SCFA represented 6.94%, MCFA 38.16% and LCFA 54.90% of fat. Only 3.04% of milk fat was PUFA, 35.83% MUFA and 61.13% was SFA. Sobczuk-Szul et al. (2015) founded that cows in early lactation had 66.74% of SFA, 29.40% of MUFA and 3.86% of PUFA. Values to PUFA were very close to our results, but SFA was lower and MUFA was higher. Van Haelst et al. (2008) showed that cows had more LCFA and less MCFA at week of ketosis diagnostic, and these authors justified increase of LCFA mainly because increase of *cis-9* C18:1, coming from lipomobilization.

Considering FA of synthesis *de novo* (C4: to C15), cows included in present study showed lower values than that founded by Genero et al. (2016). These authors founded cows in early lactation had around 23% of FA of synthesis *de novo*, and our data showed only 16%. The same study showed that pre-formed FA (C17 or more) were 49% of milk



fat, while in our research these fatty acids represent 55% of milk fat. These results can be explained by the fact that two-thirds of samples were of ketotic cows, like explained previously. Metabolites related to NEB (like NEFA and BHB) can reduce FA production by synthesis *de novo* in mammary gland and more pre-formed FA are kept from blood (Bastin et al., 2016).

Pearson correlations between 52 fatty acids and variables are showed in Table 4. In general, most of SCFA and MCFA presented negative correlation with BHB, milk fat (%) and FPR, indicating that NEB can harm synthesis *de novo* in mammary gland. But the strongest correlations observed with BHB were *cis-9* C18:1 (0.62 and 0.59 with BHB5 and BHB10, respectively), *cis-9* C18:1/C15:0 ratio (0.58 and 0.61 with BHB5 and BHB10, respectively) and *cis-9* C18:1/C14:0 ratio (0.58 and 0.60 with BHB5 and BHB10, respectively). Dórea et al. (2017) showed that C18:1 and ratios with others FA are associated with NEFA levels in blood, and can be used to identify lipomobilization intensity in early lactation cows. Contreras et al. (2010) showed that cows had more blood C18:1 in first week after calving and it can reflect in an increase of this FA in milk, because milk composition is very close to blood composition.

The *cis-9* C18:1/C15:0 ratio showed moderate correlations with many metabolites variables, like AST (0.54), CHOL (-0.43) and bilirubin (0.49, 0.46 and 0.50 to direct, indirect and total bilirubin, respectively). Another ratio, *cis-9* C16:1/C15:0 also presented moderate correlations with AST and bilirubin; 0.54 with AST and 0.53, 0.49 and 0.54 to direct, indirect and total bilirubin, respectively. As known, milk FA are provided by different ways. Maybe only one FA cannot clearly explain all changes in pathways to compound milk fat, therefore FA ratios can be used to better identify changes in early lactation.

In Table 5 is described FA profile, according ketosis prevalence in early lactation. Healthy cows presented more C4:0 to C14:0 than ketotic cows. These results are complementary to Pearson correlation and, as previously explained, cows with more intense NEB had more NEFA and BHB, and these metabolites impact negatively in synthesis *de novo*, responsible for producing SCFA and MCFA. Some LCFA, like n3 C20:3, n6 C20:3, n6 C20:4 and n3 C20:5, were higher in healthy cows, but until now the changes in very long chain FA on early lactation have not been studied.

Mann et al. (2016) founded that ketotic cows had lower C6:0, C8:0, C10:0, C12:0, C14:0 and C15:0 than healthy cows. In same study, *cis*-9 C16:1 and *cis*-9 C18:1 were higher in ketotic cows, also *cis*-9 C16:1/C15:0 and C18:1 *cis*-9/C15:0 were higher in sick cows, agreeing with present results. These authors reinforced that NEB can affect negatively the synthesis of SCFA and can be identify by lowers values in milk. Puppel et al. (2017) concluded that *cis*-9 C18:1 in milk fat is a good biomarker to identify hyperketonemia in early lactation cows, because a higher value of this FA was correlated with higher BHB values in first week after calving.

Complementing these results, sensibility and specificity of FA or ratios to identify ketosis in early lactation were described in Table 6. Nineteen FA had area under ROC curve (AUC) higher than 0.90 and they can be used satisfactorily to identify hyperketonemia in first two weeks after calving. The FA with higher AUC was C13:0 (AUC = 0.94), similar to results of Dórea et al. (2017), but this authors correlate FA with blood NEFA (AUC = 0.90). Fievez et al. (2012) indicate that odd-chain FA was synthetized in mammary gland using precursors coming from rumen and despite small amounts be identify in milk, our results indicate that cows with  $C13:0 \leq 0.049$  g/100g may develop ketosis in first 10 DIM.

*cis-9* C18:1 and more two ratio with oleic acid had AUC > 0.90 (*cis-9* C18:1 – 0.90; *cis-9* C18:1/C15:0 – 0.92; *cis-9* C18:1/C14:0 – 0.93), higher than showed by Dórea et al. (2017) that correlated milk FA profile with blood NEFA and founded AUC of 0.77, 0.81 and 0.86 to C18:1, C18:1/C14:0 and C18:1/C15:0, respectively. But the authors were unable to identify only *cis-9* C18:1, and because of this, results could be different. In same study, authors identify that C18:1 increased in milk only until 34.1 g/100g, but blood NEFA continued increasing and concluded that this can be a factor that effect AUC. By the fact of *cis-9* C18:1 is the most mobilized FA of adipose tissue during NEB, this FA can better explain intensity of NEB in early lactation than sum of all C18:1.

Evaluating risk factors associate with low performance, cows with high C17:0/C15:0 ratio had 4.79 (1.776 to 12.919 CI 95%; P=0.002) times more chance to have MY30d below average than animals with medium values of C17:0/C15:0 ratio. Only this ratio reached significance on this analysis. To MYA30d other ratio showed significance; animals with low *cis-9* C16:1/C15:0 had 3.87 (1.19 to 12.56 CI 95%; P=0.024) times more chance to have MYA30d below average than cows with medium values and cows with low SCFA had 3.78 (1.51 to 9.47 CI 95%; P=0.005) times more chance to have low MYA30d than animals with medium values. Risk factors to MY100d and MYA100d were described in Table 7 and Table 8. Cows with C17:0/C15:0 ratio > 2.109 and SCFA < 4.763 g/100g fat had 5.9 times and 4.9 times more chance and to present MY100d below average, respectively. Despite the significant result (P=0.013), *cis-9* C18:1/C14:0 ratio showed low odds ratio.

Woolpert et al. (2016) analyzed farms performance according *de novo* FA (C4 to C14) level at milk bulk tank. Farms with high *de novo* FA ( $26.2 \pm 0.94$  g/100g) had higher milk yield average than farms with low *de novo* FA ( $24.2 \pm 1.22$  g/100g), 26.3 vs. 22.7 kg/day, respectively. Farms with high *de novo* FA showed milk with high pre-formed FA

levels, 38.3 vs. 35.5 g/100g. These authors also analyzed management factors and observed that farms with high *de novo* FA had lower density cows in free-stall and higher feeding frequency, showing that management had influence in FA profile.

To reproductive outcomes, means and logistic regression did not have statistical difference, only P150d was influenced by FA profile (Table 9). Cows with *cis*-9 C18:1 > 33.607 g/100g of fat had 13.4 more likelihood to have reproductive failure at 150 DIM than animals with lower values. Stádník et al. (2015) analyzed milk FA profile in early lactation and subsequent reproductive performance and founded that high MUFA can be correlated with reproductive failure. In our study only *cis*-9 C18:1 (one of MUFA) showed that effect. LCFA and C17:0/C15:0 ratio also showed effect, but odds ratio were low. In study with primiparous conducted by Demeter et al. (2009), cows with lower reproductive performance had higher concentration of *trans* FA (include *trans*-9 C16:1, *trans*-6 C18:1, *trans*-9 C18:1, *trans*-10 C18:1, and *trans*-11 C18:1) and lower short- and medium-chain FA (C5 to C15).

Like showed by Poncheki et al. (2015), cows that have more intense NEB (loss more weight in early lactation) had a worse reproductive performance at 180 DIM. Considering that *cis*-9 C18:1 is the most mobilized FA during NEB, that explains the fact of cows with higher values of this FA had more chance to present lower reproductive outcomes.

In original data (n=694), incidence of one disease and culling or death until 60 DIM was only 26.94% and 3.75%, respectively. This farm was increasing number of animals in herd during experimental period, because of this culling was very low. FA profile and ratios were not efficient to identify incidence of one disease until 60 DIM, better FA to this variable was *trans*-16 C18:1 with AUC = 0.68 ( $\pm 0.05$ ). In other hand,

many FA can be used to predict culling or death until 60 DIM (Table 10). The C15:0 (variations or ratios) showed higher AUC to identify culling or death until 60 DIM.

Synthesis *de novo* FA can reflect rumen and udder health, because C15 precursors come from rumen fermentation and they were used by mammary gland cells to synthesize SCFA and MCFA (FIEVEZ et al., 2012). Because synthesis *de novo* FA are related with different systems (mammary and digestive systems), maybe FA with these characteristics can better explain culling or death. Cows with metabolic diseases in early lactation had more chance to be culled until 120 DIM and chance increase if more intense disorder occurs (PROBO et al., 2018). Metabolic diseases can affect many pathways, including rumen fermentation, metabolites transport in blood and synthesis *de novo* in mammary gland.

## CONCLUSION

Milk sampling is easier to be applied in a commercial dairy farm than blood sample, for example. Know more about FA profile in early lactation is important to use this like an effective management evaluation tool. To make this faster and more economic, infrared analysis can be used, because this analysis is evolving and increasingly deepening, making possible identify small concentrations or specific FA.

Ketotic cows have synthesis *de novo* impaired in early lactation, which justifies lower SCFA values in milk between 4 and 15 days after calving. Animals with ketosis also incorporate more LCFA in milk and this can be correlated with more intense lipomobilization.

Our results showed that is possible use specific FA to identify risk of ketosis incidence and culling or death in early lactation, but cannot clearly explain incidence disease. FA related with lipomobilization can negatively affect milk yield and reproductive performance. *cis*-9 C18:1, C13:0 and C15:0 and ratios seem to better explain events related with NEB in early lactation. More studies can be developed to explain correlations of very long chain FA with metabolic changes in early lactation.

## REFERENCES

- 339
- 340 Adewuyi, A. A., E. Gruys, and F. J. C. M. Van Eerdenburg. 2005. Non esterified fatty  
341 acids (NEFA) in dairy cattle. A review. *Vet. Quarterly*, 27(3):117-126.
- 342 Bastin, C., N. Gengler, and H. Soyeurt. 2011. Phenotypic and genetic variability of  
343 production traits and milk fatty acid contents across days in milk for Walloon  
344 Holstein first-parity cows. *J. Dairy Sci.* 94:4152-4163.
- 345 Bilal, G., R. I. Cue, A. F. Mustafa, and J. F. Hayes. 2014. Effects of parity, age at calving  
346 and stage of lactation on fatty acid composition of milk in Canadian Holsteins.  
347 *Can. J. Anim. Sci.* 94:401-410.
- 348 Ceciliani, F., C. Lecchi, C. Urh, and H. Sauerwein. 2018. Proteomics and metabolomics  
349 characterizing the pathophysiology of adaptive reactions to the metabolic  
350 challenges during the transition from late pregnancy to early lactation in dairy  
351 cows. *J. Proteomics*. 178:92-106.
- 352 Christie, W.W. 1982. A simple procedure for rapid transmethylation of glycerolipids and  
353 cholesterol esters. *J. Lipid R.* 23:1072.
- 354 Contreras, G. A., N. J. O'Boyle, T. H. Herdt, and L. M. Sordillo. 2010. Lipomobilization  
355 in periparturient dairy cows influences the composition of plasma nonesterified  
356 fatty acids and leukocyte phospholipid fatty acids. *J. Dairy Sci.* 93:2508-2516.
- 357 Demeter, R. M., G. C. B. Schopen, A. G. J. M. Oude Lansink, M. P. M. Meuwissen, and  
358 J. A. M. van Arendonk. 2009. Effects of milk fat composition, DGAT1, and SCD1  
359 on fertility traits in Dutch Holstein cattle. *J. Dairy Sci.* 92:5720-5729.
- 360 Dórea, J. R. R., E. A. French, and L. E. Armentano. 2017. Use of milk fatty acids to  
361 estimate plasma nonesterified fatty acid concentrations as an indicator of animal  
362 energy balance. *J. Dairy Sci.* 100:1-13.

- 363 Duffield, T. F., and R. Bagg. Herd level indicators for the prediction of high-risk dairy  
 364 herds for subclinical ketosis. In: Annual Convention of the American Association  
 365 of Bovine Practitioners, 35, 2002, Ohaio. Proceedings... Ohaio, 2002, 175-176.
- 366 Duffield, T. F., K. D. Lissemore, B. W. McBride, and K. E. Leslie. 2009. Impact of  
 367 hyperketonemia in early lactation dairy cows on health and production. J. Dairy  
 368 Sci. 92:571-580.
- 369 Fievez, V., E. Colman, J.M. Castro-Montoya, I. Stefanov, and B. Vlaeminck. 2012. Milk  
 370 odd and branched-chain fatty acids as biomarkers of rumen function - An update.  
 371 Ani. F. Sci. and Technology. 172:51-65.
- 372 Genero, G. A., C. A. Cangiano, J. P. Raimondi, J. M. Roig, and G. A. Gagliostro. 2016.  
 373 Replacing conventional with brown midrib corn silage in a total mixed ration: the  
 374 impact on early and late lactation dairy cow intake, milk yield and composition,  
 375 and milk fatty acids profile. Ani. Production Sci. 56:1136-1143.
- 376 Hara, A., N. S. Radin. 1978. Lipid extraction of tissues with low-toxicity solvent.  
 377 Analytical Biochemistry. 90:420-426.
- 378 Hayirli, A., Grummer, R. R., Nordheim, E. V. and Crump, P. M. 2002. Animal and dietary  
 379 factors affecting feed intake during the prefresh transition period in Holsteins. J.  
 380 Dairy Sci. 85:3430-3443.
- 381 Hostens, M., V. Fievez, J. L. M. R. Leroy, J. Van Ranst, B. Vlaeminck, and G. Opsomer.  
 382 2012. The fatty acid profile of subcutaneous and abdominal fat in dairy cows with  
 383 left displacement of the abomasum. J. Dairy Sci. 95:3756–3765.
- 384 Jorjong, S., A. T. M. Van Knegsel, J. Verwaeren, M. Val Lahoz, R. M. Bruckmaier, B.  
 385 De Baets, B. Kemp, and V. Fievez. 2014. Milk fatty acids as possible biomarkers  
 386 to early diagnose elevated concentrations of blood plasma nonesterified fatty acids  
 387 in dairy cows. J. Dairy Sci. 97:7054-7064.



- 388 Lukas, J. M., J. K. Reneau, R. L. Wallace, and A. De Vries. 2015. A study of methods for  
389 evaluating the success of the transition period in early-lactation dairy cows. *J.*  
390 *Dairy Sci.* 98:250-262.
- 391 Mann, S., D. V. Nydam, A. L. Lock, T. R. Overton, and J. A. A. McArt. 2016. Short  
392 communication: Association of milk fatty acids with early lactation  
393 hyperketonemia and elevated concentration of nonesterified fatty acids. *J. Dairy*  
394 *Sci.* 99:5851-5857.
- 395 Martin, A. D., N. K. Afseth, A. Kohler, Å. Randby, M. Eknæs, A. Waldmann, G. Dørum,  
396 I. Måge, and O. Reksen. 2015. The relationship between fatty acid profiles in milk  
397 identified by Fourier transform infrared spectroscopy and onset of luteal activity  
398 in Norwegian dairy cattle. *J.* 98:5374-5384.
- 399 McArt, J. A. A., D. V. Nydam, and G. R Oetzel. 2013. Epidemiology of subclinical  
400 ketosis in early lactation dairy cattle. *J. Dairy Sci.* 95:5056-5066.
- 401 McArt, J. A. A., D. V. Nydam, and M. W. Overton. 2015. Hyperketonemia in early  
402 lactation dairy cattle: a deterministic estimate of component and total cost per  
403 case. *J. Dairy Sci.* 98:2043-2054.
- 404 Mele, M., N. P. P. Macciotta, A. Cecchinato, G. Conte, S. Schiavon, and G. Bittante.  
405 2016. Multivariate factor analysis of detailed milk fatty acid profile: Effects of  
406 dairy system, feeding, herd, parity, and stage of lactation. *J. Dairy Sci.* 99:9820-  
407 9833.
- 408 Movaliya, J. K., K. S. Dutta, H. H. Savsani, and S. S. Patil. 2014. Nutritional strategy for  
409 designer milk with fat constituents beneficial for human health – a review. *Agri.*  
410 *Reviews.* 35(1):42-49.
- 411 National Research Council. 2001. *Nutrient Requirements of Dairy Cattle.* 7th rev. ed.  
412 Natl. Acad. Press, Washington, DC.

- 413 Poncheki, J. K., M. L. S. Canha, S. L. Viechnieski, R. de Almeida. 2015. Analysis of  
414 daily body weight of dairy cows in early lactation and associations with productive  
415 and reproductive performance. *Rev. Bras. Zootecnia*. 44(5):187-192.
- 416 Probo, M., O. Bogado Pascottini, S. LeBlanc, G. Opsomer, and M. Hostens. 2018.  
417 Association between metabolic diseases and the culling risk of high-yielding dairy  
418 cows in a transition management facility using survival and decision tree analysis.  
419 *J. Dairy Sci.* 101:9419-9429.
- 420 Puppel, K., P. Solarczyk, B. Kuczyńska, B. Madras-Majewska. 2017. Oleic acid as a  
421 biomarker for early diagnosis of elevated blood levels of non-esterified fatty acids  
422 and  $\beta$ -hydroxybutyric acid in the early stages of lactation in high-yielding Polish  
423 Holstein cows. *Ani. Sci. Papers and Reports*. 35(4):387-396.
- 424 Sobczuk-Szul, M., Z. Wielgosz-Groth, Z. Nogalski, M. Mochol, A. Rzemieniewski, P.  
425 Pogorzelska-Przybyłek. 2015. Changes in the fatty acid profile of cow's milk with  
426 different somatic cell counts during lactation. *Vet. Med. Zoot.* 69(91):52-57.
- 427 Stádník, L., J. Ducháček, J. Beran, R. Toušová, M. Ptáček. 2015. Relationships between  
428 milk fatty acids composition in early lactation and subsequent reproductive  
429 performance in Czech Fleckvieh cows. *Ani. Reprod. Sci.* 155:75-79.
- 430 Stoop, W. M., H. Bovenhuis, J. M. L Heck, and J. A. M. van Arendonk. 2009. Effect of  
431 lactation stage and energy status on milk fat composition of Holstein-Friesian  
432 cows. *J. Dairy Sci.* 92:1469-1478.
- 433 Suthar, V. S., J. Canelas-Raposo, A. Deniz, and W. Heuwieser. 2013. Prevalence of  
434 subclinical ketosis and relationships with postpartum diseases in European dairy  
435 cows. *J. Dairy Sci.* 96:2925-2938.

- 436 Van Haelst, Y. N. T., A. Beeckman, A. T. M. Van Kneegsel, and V. Fievez. 2008. Short  
437 communication: elevated concentrations of oleic acid and long chain fatty acids  
438 in milk fat of multiparous subclinical ketotic cows. *J. Dairy Sci.* 91:4683-4686.
- 439 Wildman, E.E., G. M. Jones, P. E. Wagner, and R. L. Boman. 1982. A dairy cow body  
440 condition system and its relationship to selected production characteristics. *J.*  
441 *Dairy Sci.* 65(3):495-501.
- 442 Woolpert, M. E., H. M. Dann, K. W. Cotanch, C. Melilli, L. E. Chase, R. J. Grant, and D.  
443 M. Barbano. 2016. Management, nutrition, and lactation performance are related  
444 to bulk tank milk de novo fatty acid concentration on northeastern US dairy farms.  
445 *J. Dairy Sci.* 99:8486-8497.
- 446

447 **Tables**448 **Table 1.** Variables included in examination of risk factors in PROC LOGISTIC to  
449 productive and reproductive outcomes.

Variable	Classes
C18:1 <i>cis</i> -9 (g/100g)	< 21.529 ≥ 21.529 and ≤ 33.607 > 33.607
C18:1 <i>cis</i> -9 / C15:0 ratio	< 30.442 ≥ 30.442 and ≤ 82.260 > 82.260
C16:1 <i>cis</i> -9 / C15:0 ratio	< 1.935 ≥ 1.935 and ≤ 5.913 > 5.913
C17:0 / C15:0 ratio	< 0.939 ≥ 0.939 and ≤ 2.109 > 2.109
C18:1 <i>cis</i> -9 / C14:0 ratio	< 2.614 ≥ 2.614 and ≤ 8.016 > 8.016
Short chain fatty acids (g/100g)	< 4.763 ≥ 4.763 and ≤ 9.121 > 9.121
Medium chain fatty acids (g/100g)	< 33.878 ≥ 33.878 and ≤ 42.450 > 42.450
Long chain fatty acids (g/100g)	< 48.823 ≥ 48.823 and ≤ 60.975 > 60.975
Saturated fatty acids (g/100g)	< 54.296 ≥ 54.296 and ≤ 67.966 > 67.966
Monounsaturated fatty acids (g/100g)	< 29.081 ≥ 29.081 and ≤ 42.583 > 42.583
Polyunsaturated fatty acids (g/100g)	< 2.557 ≥ 2.557 and ≤ 3.515 > 3.515

450

451

452 **Table 2.** Descriptive data (means and standard deviation) of 190 cows included in study,  
 453 according to parity order.

Variable	Primiparous (n=95)	Multiparous (n=95)
Days in milk	8.2 ( $\pm$ 2.4)	8.5 ( $\pm$ 2.5)
Age at calving (months)	24.2 ( $\pm$ 2.0)	51.9 ( $\pm$ 17.6)
Days to first insemination (days)	68.5 ( $\pm$ 19.5)	72.5 ( $\pm$ 21.8)
Days to effective insemination (days)	170.2 ( $\pm$ 129.8)	156.0 ( $\pm$ 104.6)
Total artificial inseminations to pregnancy	3.9 ( $\pm$ 3.8)	4.4 ( $\pm$ 3.5)
$\beta$ -hydroxybutyrate in day 5 (mmol/L)	1.45 ( $\pm$ 1.10)	1.31 ( $\pm$ 0.84)
$\beta$ -hydroxybutyrate in day 10 (mmol/L)	1.73 ( $\pm$ 1.26)	1.64 ( $\pm$ 1.13)
Body Condition Score (points)	3.54 ( $\pm$ 0.57)	3.16 ( $\pm$ 0.64)
Milk Fat (%)	4.76 ( $\pm$ 1.03)	4.69 ( $\pm$ 1.04)
Milk Protein (%)	3.53 ( $\pm$ 0.36)	3.47 ( $\pm$ 0.42)
Fat to Protein Ratio	1.37 ( $\pm$ 0.36)	1.38 ( $\pm$ 0.38)
MYA <sup>1</sup> in first 30 days (L/day)	29.1 ( $\pm$ 5.3)	35.8 ( $\pm$ 9.2)
MYA <sup>1</sup> in first 100 days (L/day)	35.9 ( $\pm$ 5.6)	40.7 ( $\pm$ 9.8)
MY <sup>2</sup> in first 100 days (L/cow)	3,395.2 ( $\pm$ 669.0)	3,801.0 ( $\pm$ 1,281.9)
MY <sup>2</sup> in first 30 days (L/cow)	795.6 ( $\pm$ 268.1)	990.0 ( $\pm$ 384.1)
Aspartate aminotransferase (U/L)	77.7 ( $\pm$ 33.3)	93.2 ( $\pm$ 56.9)
Albumin (g/dL)	3.3 ( $\pm$ 0.3)	3.4 ( $\pm$ 0.4)
Cholesterol (mg/dL)	71.6 ( $\pm$ 28.1)	66.5 ( $\pm$ 23.5)
Triglycerides (mg/dL)	9.5 ( $\pm$ 2.3)	8.2 ( $\pm$ 1.8)
Very Low Density Lipoprotein (mg/dL)	2.1 ( $\pm$ 1.7)	1.6 ( $\pm$ 0.3)
$\beta$ -hydroxybutyrate in serum (mmol/L)	1.44 ( $\pm$ 1.09)	1.30 ( $\pm$ 0.94)
Direct Bilirubin (mg/dL)	0.085 ( $\pm$ 0.036)	0.091 ( $\pm$ 0.057)
Indirect Bilirubin (mg/dL)	0.166 ( $\pm$ 0.118)	0.276 ( $\pm$ 0.371)
Total Bilirubin (mg/dL)	0.251 ( $\pm$ 0.148)	0.367 ( $\pm$ 0.399)

454 <sup>1</sup>Milk yield average; <sup>2</sup>Cumulative milk yield.

455 **Table 3.** Milk fatty acids profile in early lactation, according parity order, in g/100g of  
 456 fat.

Variable	Multiparous	Primiparous	All animals
C4:0	3.300 ( $\pm 0.645$ )	3.324 ( $\pm 0.558$ )	3.312 ( $\pm 0.602$ )
C6:0	1.452 ( $\pm 0.590$ )	1.434 ( $\pm 0.481$ )	1.443 ( $\pm 0.537$ )
C8:0	0.744 ( $\pm 0.410$ )	0.682 ( $\pm 0.378$ )	0.713 ( $\pm 0.395$ )
C10:0	1.502 ( $\pm 1.008$ )	1.353 ( $\pm 0.697$ )	1.427 ( $\pm 0.867$ )
C10:1	0.075 ( $\pm 0.059$ )	0.057 ( $\pm 0.040$ )	0.066 ( $\pm 0.051$ )
C11:0	0.021 ( $\pm 0.023$ )	0.020 ( $\pm 0.016$ )	0.021 ( $\pm 0.020$ )
C12:0	1.618 ( $\pm 1.081$ )	1.422 ( $\pm 0.709$ )	1.520 ( $\pm 0.917$ )
C12:1	0.015 ( $\pm 0.010$ )	0.015 ( $\pm 0.011$ )	0.015 ( $\pm 0.011$ )
C13:0	0.058 ( $\pm 0.049$ )	0.049 ( $\pm 0.029$ )	0.054 ( $\pm 0.040$ )
iso C13:0	0.016 ( $\pm 0.010$ )	0.019 ( $\pm 0.011$ )	0.018 ( $\pm 0.010$ )
anteiso C13:0	0.020 ( $\pm 0.015$ )	0.014 ( $\pm 0.011$ )	0.017 ( $\pm 0.013$ )
C14:0	6.374 ( $\pm 2.604$ )	5.932 ( $\pm 1.635$ )	6.153 ( $\pm 2.180$ )
iso C14:0	0.054 ( $\pm 0.019$ )	0.074 ( $\pm 0.020$ )	0.064 ( $\pm 0.022$ )
<i>cis</i> -9 C14:1	0.385 ( $\pm 0.141$ )	0.374 ( $\pm 0.116$ )	0.379 ( $\pm 0.129$ )
C15:0	0.547 ( $\pm 0.206$ )	0.579 ( $\pm 0.161$ )	0.563 ( $\pm 0.185$ )
iso C15:0	0.135 ( $\pm 0.038$ )	0.170 ( $\pm 0.048$ )	0.152 ( $\pm 0.046$ )
anteiso C15:0	0.227 ( $\pm 0.085$ )	0.263 ( $\pm 0.080$ )	0.245 ( $\pm 0.084$ )
C16:0	27.785 ( $\pm 2.771$ )	25.899 ( $\pm 1.597$ )	26.842 ( $\pm 2.446$ )
iso C16:0	0.185 ( $\pm 0.041$ )	0.236 ( $\pm 0.040$ )	0.210 ( $\pm 0.048$ )
<i>cis</i> -9 C16:1	1.868 ( $\pm 0.634$ )	1.958 ( $\pm 0.448$ )	1.913 ( $\pm 0.549$ )
iso C17:0	0.341 ( $\pm 0.066$ )	0.365 ( $\pm 0.066$ )	0.353 ( $\pm 0.067$ )
C17:0	0.745 ( $\pm 0.116$ )	0.786 ( $\pm 0.106$ )	0.766 ( $\pm 0.113$ )
C17:1	0.289 ( $\pm 0.107$ )	0.325 ( $\pm 0.095$ )	0.307 ( $\pm 0.103$ )
C18:0	16.451 ( $\pm 2.981$ )	17.839 ( $\pm 2.514$ )	17.145 ( $\pm 2.837$ )
<i>cis</i> -9 C18:1	27.154 ( $\pm 6.678$ )	27.982 ( $\pm 5.329$ )	27.568 ( $\pm 6.039$ )
<i>cis</i> -11 C18:1	1.813 ( $\pm 1.055$ )	1.858 ( $\pm 0.965$ )	1.835 ( $\pm 1.009$ )
<i>cis</i> -12 C18:1	0.815 ( $\pm 0.455$ )	0.815 ( $\pm 0.455$ )	0.815 ( $\pm 0.454$ )
<i>cis</i> -13 C18:1	0.448 ( $\pm 0.328$ )	0.441 ( $\pm 0.306$ )	0.444 ( $\pm 0.316$ )
<i>cis</i> -15 C18:1	0.120 ( $\pm 0.044$ )	0.119 ( $\pm 0.040$ )	0.120 ( $\pm 0.042$ )
<i>trans</i> C18:1	1.740 ( $\pm 0.555$ )	2.008 ( $\pm 0.509$ )	1.874 ( $\pm 0.548$ )
<i>trans</i> -16 C18:1	0.368 ( $\pm 0.088$ )	0.428 ( $\pm 0.089$ )	0.398 ( $\pm 0.093$ )
<i>cis</i> -9, <i>cis</i> -12 CLA <sup>1</sup>	2.486 ( $\pm 0.434$ )	2.196 ( $\pm 0.366$ )	2.341 ( $\pm 0.426$ )
<i>cis</i> -9, <i>trans</i> -11 CLA <sup>1</sup>	0.221 ( $\pm 0.084$ )	0.273 ( $\pm 0.096$ )	0.247 ( $\pm 0.094$ )
<i>trans</i> -10, <i>cis</i> -12 CLA <sup>1</sup>	0.002 ( $\pm 0.001$ )	0.004 ( $\pm 0.003$ )	0.003 ( $\pm 0.003$ )
n3 C18:3	0.224 ( $\pm 0.058$ )	0.242 ( $\pm 0.052$ )	0.233 ( $\pm 0.056$ )
n6 C18:3	0.017 ( $\pm 0.012$ )	0.016 ( $\pm 0.012$ )	0.016 ( $\pm 0.012$ )
C20:0	0.082 ( $\pm 0.027$ )	0.099 ( $\pm 0.032$ )	0.090 ( $\pm 0.031$ )
C20:1	0.080 ( $\pm 0.048$ )	0.079 ( $\pm 0.039$ )	0.079 ( $\pm 0.043$ )
C20:2	0.012 ( $\pm 0.009$ )	0.009 ( $\pm 0.006$ )	0.010 ( $\pm 0.008$ )
n3 C20:3	0.004 ( $\pm 0.003$ )	0.007 ( $\pm 0.006$ )	0.005 ( $\pm 0.005$ )
n6 C20:3	0.042 ( $\pm 0.028$ )	0.038 ( $\pm 0.021$ )	0.040 ( $\pm 0.025$ )
n6 C20:4	0.112 ( $\pm 0.047$ )	0.115 ( $\pm 0.037$ )	0.113 ( $\pm 0.042$ )
n3 C20:5	0.015 ( $\pm 0.009$ )	0.018 ( $\pm 0.014$ )	0.017 ( $\pm 0.012$ )

Variable	Multiparous	Primiparous	All animals
C21:0	0.010 ( $\pm 0.008$ )	0.014 ( $\pm 0.009$ )	0.012 ( $\pm 0.009$ )
C22:0	0.025 ( $\pm 0.015$ )	0.028 ( $\pm 0.022$ )	0.026 ( $\pm 0.019$ )
n9 C22:1	0.028 ( $\pm 0.018$ )	0.035 ( $\pm 0.020$ )	0.032 ( $\pm 0.019$ )
C22:2	0.003 ( $\pm 0.002$ )	0.004 ( $\pm 0.003$ )	0.004 ( $\pm 0.002$ )
C22:5	0.032 ( $\pm 0.023$ )	0.035 ( $\pm 0.028$ )	0.034 ( $\pm 0.026$ )
n3 C22:6	0.003 ( $\pm 0.002$ )	0.005 ( $\pm 0.005$ )	0.004 ( $\pm 0.004$ )
C23:0	0.007 ( $\pm 0.005$ )	0.008 ( $\pm 0.005$ )	0.007 ( $\pm 0.005$ )
C24:0	0.010 ( $\pm 0.006$ )	0.014 ( $\pm 0.007$ )	0.012 ( $\pm 0.007$ )
C24:1	0.010 ( $\pm 0.008$ )	0.015 ( $\pm 0.014$ )	0.013 ( $\pm 0.012$ )
<i>cis</i> -9 C16:1 /C15:0	4.108 ( $\pm 2.343$ )	3.739 ( $\pm 1.548$ )	3.924 ( $\pm 1.989$ )
<i>cis</i> -9 C18:1/C15:0	59.066 ( $\pm 29.442$ )	53.639 ( $\pm 21.635$ )	56.352 ( $\pm 25.910$ )
anteiso C15:0/C17:0	0.326 ( $\pm 0.164$ )	0.346 ( $\pm 0.132$ )	0.336 ( $\pm 0.149$ )
anteiso C15:0/ iso C17:0	0.668 ( $\pm 0.221$ )	0.730 ( $\pm 0.193$ )	0.699 ( $\pm 0.210$ )
C17:0/C15:0	1.584 ( $\pm 0.699$ )	1.464 ( $\pm 0.438$ )	1.524 ( $\pm 0.585$ )
<i>cis</i> -9 C18:1/C14:0	5.387 ( $\pm 3.172$ )	5.243 ( $\pm 2.144$ )	5.315 ( $\pm 2.701$ )
SCFA <sup>2</sup>	7.057 ( $\pm 2.396$ )	6.827 ( $\pm 1.945$ )	6.942 ( $\pm 2.179$ )
MCFA <sup>3</sup>	39.304 ( $\pm 5.139$ )	37.024 ( $\pm 2.810$ )	38.164 ( $\pm 4.286$ )
LCFA <sup>4</sup>	53.649 ( $\pm 7.105$ )	56.149 ( $\pm 4.538$ )	54.899 ( $\pm 6.076$ )
SFA <sup>5</sup>	61.675 ( $\pm 7.695$ )	60.587 ( $\pm 5.840$ )	61.131 ( $\pm 6.835$ )
MUFA <sup>6</sup>	35.188 ( $\pm 7.600$ )	36.476 ( $\pm 5.748$ )	35.832 ( $\pm 6.751$ )
PUFA <sup>7</sup>	3.140 ( $\pm 0.499$ )	2.933 ( $\pm 0.437$ )	3.036 ( $\pm 0.479$ )

457 <sup>1</sup>Conjugated linoleic acid; <sup>2</sup>Short chain fatty acids (C4 to C10); <sup>3</sup>Medium chain fatty acids  
458 (C11 to C16); <sup>4</sup>Long chain fatty acids (C17 or more); <sup>5</sup>Saturated fatty acids;  
459 <sup>6</sup>Monounsaturated fatty acids; <sup>7</sup>Polyunsaturated fatty acids.

**Table 4.** Pearson correlations between milk fatty acids (g/100g of fat) and others variables in early lactation dairy cows.

Variable	Parity	BHB5 <sup>1</sup>	BHB10 <sup>2</sup>	BCS <sup>3</sup>	%F <sup>4</sup>	%P <sup>5</sup>	FPR <sup>6</sup>	MYA 30d <sup>7</sup>	MYA 100d <sup>8</sup>	MY 30d <sup>9</sup>	MY 100d <sup>10</sup>	AST <sup>11</sup>	ALB <sup>12</sup>	CHOL <sup>13</sup>	TG <sup>14</sup>	Bill <sup>15</sup>	Bill <sup>16</sup>	Bit <sup>17</sup>
C4:0	-0.09	-0.40***	-0.40***	0.09	-0.17*	0.30***	-0.28***	0.23**	0.23**	0.09	0.16*	-0.38***	0.24**	0.24***	-0.15*	-0.22*	-0.21†	-0.22*
C6:0	-0.20*	-0.57***	-0.57***	0.10	-0.35***	0.46***	-0.48***	0.15*	0.17*	0.12	0.18*	-0.42***	0.28***	0.23**	-0.12†	-0.37***	-0.32*	-0.35***
C8:0	-0.14†	-0.55***	-0.54***	0.07	-0.35***	0.42***	-0.46***	0.11	0.11	0.09	0.13†	-0.37***	0.25***	0.20**	-0.13†	-0.37***	-0.30**	-0.34**
C10:0	-0.14†	-0.55***	-0.55***	0.03	-0.39***	0.43***	-0.49***	0.09	0.09	0.11	0.14†	-0.39***	0.24***	0.23**	-0.13†	-0.36***	-0.31**	-0.34**
C10:1	-0.05	-0.50***	-0.48***	-0.06	-0.43***	0.36***	-0.50***	0.07	0.09	0.07	0.12†	-0.35***	0.16*	0.17*	-0.14†	-0.40***	-0.28**	-0.32**
C11:0	-0.09	-0.47***	-0.49***	-0.02	-0.40***	0.32***	-0.46***	-0.02	-0.01	0.06	0.07	-0.32***	0.21**	0.29***	-0.10	-0.34**	-0.26*	-0.30**
C12:0	-0.12	-0.55***	-0.55***	0.00	-0.41***	0.45***	-0.52***	0.07	0.06	0.10	0.12	-0.40***	0.23**	0.23**	-0.14*	-0.37***	-0.30**	-0.34**
C12:1	-0.16*	-0.11	-0.03	0.19**	-0.27***	0.28***	-0.33***	0.05	0.13†	0.01	0.14†	-0.18*	0.02	-0.15*	-0.03	-0.15	-0.12	-0.13
C13:0	-0.08	-0.49***	-0.50***	-0.04	-0.43***	0.39***	-0.51***	0.04	0.06	0.05	0.09	-0.36***	0.21**	0.19**	-0.15*	-0.37***	-0.27**	-0.32**
C13:0i	-0.16*	-0.51***	-0.51***	-0.18*	-0.47***	0.18*	-0.46***	-0.01	-0.09	0.09	0.00	-0.36***	0.18*	0.45***	-0.10	-0.45***	-0.31**	-0.36***
C13:0a	0.08	-0.45***	-0.33***	-0.24***	-0.39***	0.24**	-0.41***	-0.02	-0.03	0.02	0.02	-0.25***	0.01	0.16*	-0.15*	-0.31**	-0.23*	-0.26*
C14:0	-0.14†	-0.54***	-0.55***	-0.02	-0.38***	0.46***	-0.49***	0.13†	0.14†	0.12	0.17*	-0.41***	0.21**	0.22**	-0.17*	-0.39***	-0.33**	-0.36***
iC14:0	-0.52***	-0.21**	-0.27***	0.11	-0.30***	0.37***	-0.41***	-0.06	-0.06	-0.00	0.02	-0.38***	0.01	0.13†	0.02	-0.27*	-0.29*	-0.31**
c9 C14:1	-0.01	0.00	-0.02	-0.01	0.00	0.01	0.01	-0.07	0.03	-0.09	0.01	0.01	-0.19**	-0.09	0.05	0.06	0.16	0.16
C15:0	-0.24**	-0.51***	-0.53***	-0.14*	-0.51***	0.36***	-0.56***	-0.00	-0.04	0.08	0.05	-0.43***	0.23**	0.38***	-0.10	-0.43***	-0.37***	-0.41***
iC15:0	-0.44***	-0.46***	-0.44***	-0.07	-0.43***	0.34***	-0.50***	-0.13†	-0.13†	-0.04	-0.04	-0.38***	0.10	0.36***	-0.02	-0.40***	-0.38***	-0.41***
aC15:0	-0.34***	-0.49***	-0.49***	-0.10	-0.51***	0.34***	-0.56***	0.01	-0.01	0.05	0.06	-0.45***	0.20**	0.36***	-0.08	-0.46***	-0.43***	-0.47***
C16:0	0.41***	-0.20**	-0.18*	-0.15*	-0.03	0.15*	-0.07	-0.07	-0.08	-0.06	-0.08	0.02	-0.01	-0.04	-0.15*	-0.23*	-0.21†	-0.23*
iC16:0	-0.57***	0.00	-0.14†	0.18*	-0.08	0.28***	-0.19**	-0.08	-0.02	-0.05	0.03	-0.27***	-0.11	-0.01	0.09	-0.18†	-0.28**	-0.28**
c9 C16:1	0.05	0.43***	0.43***	0.03	0.45***	-0.41***	0.54***	-0.12	-0.05	-0.13†	-0.11	0.39***	-0.29***	-0.23**	0.15*	0.48***	0.48***	0.52***
iC17:0	-0.18*	-0.13†	-0.14†	-0.06	-0.19*	0.23**	-0.25***	-0.03	0.03	-0.13†	-0.04	-0.16*	-0.02	-0.02	-0.07	-0.12	-0.14	-0.14
C17:0	0.04	0.40***	0.42***	-0.04	0.35***	-0.23**	0.38***	-0.29***	-0.26***	-0.24**	-0.28***	0.32***	-0.21**	-0.18*	0.16*	0.39***	0.19†	0.24*
C17:1	-0.02	0.50***	0.54***	0.18*	0.42***	-0.29***	0.47***	-0.12†	-0.01	-0.17*	-0.10	0.42***	-0.26***	-0.38***	0.17*	0.48***	0.43***	0.47***
C18:0	-0.16*	-0.15*	-0.09	-0.03	-0.12	-0.02	-0.11	0.03	-0.11	0.13†	-0.00	-0.16*	0.21**	0.27***	-0.01	-0.08	-0.21*	-0.21†



Variable	Parity	BHB5 <sup>1</sup>	BHB10 <sup>2</sup>	BCS <sup>3</sup>	%F <sup>4</sup>	%P <sup>5</sup>	FPR <sup>6</sup>	MYA 30d <sup>7</sup>	MYA 100d <sup>8</sup>	MY 30d <sup>9</sup>	MY 100d <sup>10</sup>	AST <sup>11</sup>	ALB <sup>12</sup>	CHOL <sup>13</sup>	TG <sup>14</sup>	BiID <sup>15</sup>	BiIT <sup>16</sup>	BiIT <sup>17</sup>
<i>r</i> C18:1	-0.32***	-0.17*	-0.20**	0.18*	-0.20**	0.33***	-0.31***	0.05	0.12†	0.01	0.10	-0.28***	0.07	-0.00	0.06	-0.26*	-0.38***	-0.39***
<i>c9</i> C18:1	0.07	0.62***	0.59***	0.13†	0.43***	-0.36***	0.50***	-0.08	0.02	-0.15*	-0.08	0.43***	-0.26***	-0.40***	0.19*	0.43***	0.44***	0.47***
<i>c11</i> C18:1	0.04	0.04	0.10	-0.23**	0.01	-0.37***	0.17*	-0.07	-0.18*	0.06	-0.10	0.12	-0.07	0.23**	0.01	0.42***	0.42***	0.45***
<i>c12</i> C18:1	0.04	-0.05	0.01	-0.29***	-0.05	-0.34***	0.10	-0.05	-0.17*	0.09	-0.09	0.04	-0.06	0.31***	0.01	-0.13	-0.19†	-0.19†
<i>c13</i> C18:1	0.06	-0.03	0.04	-0.27***	-0.04	-0.32***	0.10	-0.05	-0.17*	0.08	-0.08	0.07	-0.02	0.30***	-0.01	0.40***	0.46***	0.49***
<i>c15</i> C18:1	-0.00	0.22**	0.19*	0.24**	0.12†	0.01	0.10	0.03	0.14†	-0.09	0.03	0.08	-0.04	-0.20**	0.14†	-0.07	-0.24*	-0.23*
<i>t16</i> C18:1	-0.28***	-0.13†	-0.08	-0.09	-0.21**	-0.15*	-0.11	0.00	-0.11	0.12	-0.01	-0.16*	0.16*	0.47***	0.04	-0.30**	-0.38***	-0.39***
<i>c9, c12</i> CLA <sup>18</sup>	0.32***	0.01	-0.08	-0.35***	-0.20**	-0.18*	-0.10	0.15*	0.03	0.13†	-0.01	0.00	-0.11	0.11	-0.07	-0.10	-0.12	-0.13
<i>c9, t11</i> CLA <sup>18</sup>	-0.25***	0.27***	0.20**	0.23**	0.07	0.04	0.04	-0.11	0.04	-0.16*	-0.00	0.03	-0.24**	-0.27***	0.17*	-0.13	-0.07	-0.09
<i>t10, c12</i> CLA <sup>18</sup>	-0.11	-0.29	-0.12	-0.12	-0.36	0.20	-0.30	-0.12	-0.05	-0.17	-0.12	-0.01	0.18	0.26	0.20	-0.09	-0.67	-0.61
n6 C18:3	-0.06	-0.05	-0.01	0.11	-0.07	0.23**	-0.16*	0.22**	0.24**	0.08	0.20*	-0.11	0.20*	-0.06	-0.09	-0.18	-0.07	-0.09
n3 C18:3	-0.27***	-0.06	-0.06	-0.02	-0.26***	0.19**	-0.29***	-0.07	-0.04	-0.11	-0.07	-0.21**	-0.01	0.06	-0.03	-0.17	-0.17	-0.19†
C20:0	-0.29***	-0.19**	-0.22**	-0.04	-0.27***	-0.05	-0.21**	-0.09	-0.13†	-0.04	-0.10	-0.26***	0.27***	0.44***	0.03	-0.19†	-0.27*	-0.28**
C20:1	0.02	0.11	0.14†	-0.20**	0.03	-0.23**	0.13†	-0.03	-0.12	0.06	-0.05	0.04	-0.01	0.14†	0.06	0.01	0.21†	0.19†
C20:2	0.08	-0.08	-0.11	0.04	-0.04	0.16	-0.11	0.14	0.20*	0.06	0.17	-0.01	-0.11	-0.24*	-0.23*	-0.02	-0.12	-0.12
n6 C20:3	0.00	-0.15†	-0.12	0.08	-0.21**	0.17*	-0.26***	0.16*	0.21**	0.10	0.15†	-0.18*	0.15*	0.10	-0.13†	-0.27*	-0.33**	-0.33**
n3 C20:3	-0.25†	-0.43***	-0.38**	0.06	-0.31*	0.14	-0.33*	0.03	0.03	0.04	0.06	-0.27*	0.04	0.16	-0.06	-0.43	-0.43	-0.44
n6 C20:4	-0.20**	-0.30***	-0.31***	0.00	-0.33***	0.30***	-0.40***	0.07	0.15*	0.02	0.11	-0.31***	0.13†	0.10	-0.11	-0.31**	-0.34**	-0.35**
n3 C20:5	-0.18*	-0.20**	-0.07	0.10	-0.21**	0.20**	-0.27***	0.02	0.02	-0.02	-0.04	-0.28***	0.20**	0.19*	-0.11	-0.32**	-0.41***	-0.41***
C21:0	-0.22*	-0.11	-0.02	0.30**	0.04	0.24*	-0.07	0.06	0.08	0.07	0.07	-0.18†	0.02	-0.10	0.05	-0.18	-0.34*	-0.34*
C22:0	-0.13†	-0.18*	-0.03	-0.04	-0.31***	0.02	-0.26***	-0.01	-0.07	0.08	-0.04	-0.17*	0.12	0.21**	0.04	-0.19	-0.39***	-0.36**
n9 C22:1	-0.18†	0.11	0.02	-0.19†	-0.10	-0.18†	-0.03	0.02	-0.03	0.06	0.02	-0.10	0.12	0.33***	-0.04	-0.22	-0.20	-0.21
C22:2	-0.09	-0.22	-0.23	0.32	-0.10	0.49*	-0.26	0.07	0.07	0.08	0.08	-0.26	0.21	0.05	-0.17	0.62	-0.65	-0.64
C22:5	-0.15*	-0.10	-0.17*	0.06	-0.05	0.17*	-0.10	-0.01	0.06	0.02	0.07	0.04	-0.03	-0.04	-0.13	0.13	-0.03	-0.01
n3 C22:6	-0.20†	0.06	0.03	0.18	-0.01	0.07	-0.02	0.07	0.07	0.10	0.04	-0.11	-0.03	-0.23†	0.15	-0.27	-0.27	-0.28

Variable	Parity	BHB <sup>1</sup>	BHB <sup>10</sup>	BCS <sup>3</sup>	%F <sup>4</sup>	%P <sup>5</sup>	FPR <sup>6</sup>	MYA 30d <sup>7</sup>	MYA 100d <sup>8</sup>	MY 30d <sup>9</sup>	MY 100d <sup>10</sup>	AST <sup>11</sup>	ALB <sup>12</sup>	CHOL <sup>13</sup>	TG <sup>14</sup>	BiID <sup>15</sup>	BiI <sup>16</sup>	BiT <sup>17</sup>
C23:0	-0.13	-0.07	-0.17†	0.21*	-0.10	0.12	-0.15	-0.10	-0.02	-0.12	-0.06	-0.21*	0.06	0.01	0.03	-0.03	-0.35*	-0.29†
C24:0	-0.32***	-0.32***	-0.35***	0.01	-0.44***	0.19*	-0.45***	-0.09	-0.14	0.03	-0.08	-0.34***	0.28***	0.45***	0.02	-0.22†	-0.38*	-0.39***
C24:1	-0.18†	-0.30**	-0.03	-0.04	-0.33***	0.03	-0.27**	-0.13	-0.20*	-0.11	-0.17†	-0.16	0.23*	0.44***	-0.04	-0.33	-0.32	-0.32
c9 C18:1/C15:0	0.26***	0.58***	0.61***	0.16*	0.47***	-0.36***	0.54***	-0.12†	-0.03	-0.17*	-0.11	0.54***	-0.26***	-0.43***	0.13†	0.49***	0.46***	0.50***
c9 C16:1/C15:0	0.26***	0.51***	0.53***	0.13†	0.50***	-0.40***	0.58***	-0.16*	-0.08	-0.17*	-0.13†	0.54***	-0.27***	-0.36***	0.12†	0.53***	0.49***	0.54***
aC15:0/C17:0	-0.24***	-0.52***	-0.53***	-0.06	-0.51***	0.34***	-0.56***	0.07	0.05	0.11	0.12	-0.44***	0.24**	0.34***	-0.11	-0.44***	-0.37***	-0.41***
aC15:0/C17:0	-0.30***	-0.43***	-0.48***	-0.08	-0.45***	0.24**	-0.47***	0.06	-0.00	0.16*	0.11	-0.43***	0.22*	0.42***	-0.06	-0.41***	-0.38***	-0.41***
C17:0/C15:0	0.33***	0.51***	0.58***	0.11	0.48***	-0.34***	0.54***	-0.21**	-0.15*	-0.20**	-0.20**	0.55***	-0.25***	-0.38***	0.13†	0.52***	0.39***	0.44***
c9 C18:1/C14:0	0.23**	0.58***	0.60***	0.08	0.34***	-0.41***	0.45***	-0.18*	-0.16*	-0.14†	-0.19**	0.52***	-0.18*	-0.29***	0.18*	0.43***	0.40***	0.40***
SCFA <sup>19</sup>	-0.15*	-0.58***	-0.58***	0.07	-0.37***	0.46***	-0.49***	0.16*	0.17*	0.12	0.18*	-0.44***	0.28***	0.26***	-0.15*	-0.38***	-0.32**	-0.35***
MCFA <sup>20</sup>	0.11	-0.49***	-0.49***	-0.09	-0.29***	0.40***	-0.39***	0.02	0.02	0.03	0.06	-0.28***	0.12†	0.13†	-0.19**	-0.34**	-0.28**	-0.31**
LCFA <sup>21</sup>	-0.02	0.55***	0.56***	0.04	0.34***	-0.45***	0.45***	-0.07	-0.08	-0.06	-0.10	0.35***	-0.19*	-0.19*	0.19*	0.37***	0.31**	0.34**
SFA <sup>22</sup>	-0.06	-0.58***	-0.56***	-0.05	-0.38***	0.43***	-0.49***	0.08	0.02	0.12	0.09	-0.41***	0.28***	0.30***	-0.18*	-0.43***	-0.43***	-0.46***
MUFA <sup>23</sup>	0.04	0.58***	0.57***	0.07	0.41***	-0.43***	0.51***	-0.09	-0.02	-0.12†	-0.09	0.42***	-0.27***	-0.31***	0.19**	0.44***	0.44***	0.47***
PUFA <sup>24</sup>	0.17*	0.01	-0.08	-0.25***	-0.24***	-0.07	-0.18*	0.13†	0.06	0.08	0.00	-0.06	-0.11	0.07	-0.06	-0.17	-0.22*	-0.23*

<sup>1</sup>BHB (mmol/L) in day 5 after calving; <sup>2</sup>BHB (mmol/L) in day 10 after calving; <sup>3</sup>Body Condition Score; <sup>4</sup>Percentage of milk fat; <sup>5</sup>Percentage of milk protein; <sup>6</sup>Fat to protein ratio; <sup>7</sup>Milk yield average in first 30 DIM (L/cow/day); <sup>8</sup>Milk yield average in first 100 DIM (L/cow/day); <sup>9</sup>Cumulative milk yield in first 30 DIM (L/cow); <sup>10</sup>Cumulative milk yield in first 100 DIM (L/cow); <sup>11</sup>Aspartate aminotransferase (U/L); <sup>12</sup>Albumin (mg/dL); <sup>13</sup>Cholesterol (mg/dL); <sup>14</sup>Triglycerides (mg/dL); <sup>15</sup>Direct bilirubin (mg/dL); <sup>16</sup>Indirect bilirubin (mg/dL); <sup>17</sup>Total bilirubin (mg/dL); <sup>18</sup>Conjugated linoleic acid; <sup>19</sup>Short chain fatty acids (C4 to C10); <sup>20</sup>Medium chain fatty acids (C11 to C16); <sup>21</sup>Long chain fatty acids (C17 or more); <sup>22</sup>Saturated fatty acids; <sup>23</sup>Monounsaturated fatty acids; <sup>24</sup>Polyunsaturated fatty acids.

a – anteiso; i – iso; c – cis; t – trans;

†  $P < 0.10$ ; \*  $P < 0.05$ ; \*\*  $P < 0.01$ ; \*\*\*  $P < 0.001$ .

470 **Table 5.** Least square means ( $\pm$ SD) of milk fatty acids and fatty acids ratios between 4  
 471 and 15 DIM of healthy, subclinical or clinical ketosis dairy cows.

Variable	Healthy	Subclinical ketosis	Clinical ketosis
C4:0	3.574 ( $\pm$ 0.071) <sup>a</sup>	3.225 ( $\pm$ 0.061) <sup>b***</sup>	2.881 ( $\pm$ 0.101) <sup>c***</sup>
C6:0	1.913 ( $\pm$ 0.049) <sup>a</sup>	1.192 ( $\pm$ 0.042) <sup>b***</sup>	1.019 ( $\pm$ 0.070) <sup>c***</sup>
C8:0	1.060 ( $\pm$ 0.036) <sup>a</sup>	0.506 ( $\pm$ 0.031) <sup>b***</sup>	0.440 ( $\pm$ 0.053) <sup>b***</sup>
C10:0	2.225 ( $\pm$ 0.078) <sup>a</sup>	0.978 ( $\pm$ 0.066) <sup>b***</sup>	0.844 ( $\pm$ 0.111) <sup>b***</sup>
C10:1	0.109 ( $\pm$ 0.005) <sup>a</sup>	0.040 ( $\pm$ 0.004) <sup>b***</sup>	0.041 ( $\pm$ 0.007) <sup>b***</sup>
C11:0	0.036 ( $\pm$ 0.002) <sup>a</sup>	0.012 ( $\pm$ 0.002) <sup>b***</sup>	0.009 ( $\pm$ 0.003) <sup>b***</sup>
C12:0	2.369 ( $\pm$ 0.082) <sup>a</sup>	1.038 ( $\pm$ 0.070) <sup>b***</sup>	0.935 ( $\pm$ 0.117) <sup>b***</sup>
C12:1	0.018 ( $\pm$ 0.001) <sup>a</sup>	0.011 ( $\pm$ 0.001) <sup>b***</sup>	0.015 ( $\pm$ 0.002) <sup>ab</sup>
C13:0	0.090 ( $\pm$ 0.004) <sup>a</sup>	0.032 ( $\pm$ 0.003) <sup>b***</sup>	0.032 ( $\pm$ 0.005) <sup>b***</sup>
aC13:0	0.026 ( $\pm$ 0.001) <sup>a</sup>	0.012 ( $\pm$ 0.001) <sup>b***</sup>	0.015 ( $\pm$ 0.002) <sup>b***</sup>
iC13:0	0.023 ( $\pm$ 0.001) <sup>a</sup>	0.013 ( $\pm$ 0.001) <sup>b***</sup>	0.012 ( $\pm$ 0.001) <sup>b***</sup>
C14:0	8.148 ( $\pm$ 0.200) <sup>a</sup>	5.068 ( $\pm$ 0.171) <sup>b***</sup>	4.773 ( $\pm$ 0.285) <sup>b***</sup>
iC14:0	0.072 ( $\pm$ 0.002) <sup>a</sup>	0.060 ( $\pm$ 0.002) <sup>b***</sup>	0.054 ( $\pm$ 0.003) <sup>c***</sup>
c9 C14:1	0.393 ( $\pm$ 0.016)	0.365 ( $\pm$ 0.014)	0.408 ( $\pm$ 0.023)
C15:0	0.724 ( $\pm$ 0.018) <sup>a</sup>	0.478 ( $\pm$ 0.015) <sup>b***</sup>	0.455 ( $\pm$ 0.025) <sup>b***</sup>
aC15:0	0.314 ( $\pm$ 0.008) <sup>a</sup>	0.210 ( $\pm$ 0.007) <sup>b***</sup>	0.199 ( $\pm$ 0.012) <sup>b***</sup>
iC15:0	0.184 ( $\pm$ 0.004) <sup>a</sup>	0.139 ( $\pm$ 0.004) <sup>b***</sup>	0.128 ( $\pm$ 0.006) <sup>b***</sup>
C16:0	27.746 ( $\pm$ 0.277) <sup>a</sup>	26.280 ( $\pm$ 0.237) <sup>b***</sup>	26.447 ( $\pm$ 0.396) <sup>b***</sup>
iC16:0	0.219 ( $\pm$ 0.005) <sup>a</sup>	0.207 ( $\pm$ 0.004) <sup>b†</sup>	0.194 ( $\pm$ 0.007) <sup>b**</sup>
c9 C16:1	1.546 ( $\pm$ 0.056) <sup>c***</sup>	2.140 ( $\pm$ 0.048) <sup>b†</sup>	2.300 ( $\pm$ 0.081) <sup>a</sup>
iC17:0	0.381 ( $\pm$ 0.008) <sup>a</sup>	0.342 ( $\pm$ 0.007) <sup>b***</sup>	0.343 ( $\pm$ 0.012) <sup>b**</sup>
C17:0	0.695 ( $\pm$ 0.012) <sup>b***</sup>	0.807 ( $\pm$ 0.011) <sup>a</sup>	0.816 ( $\pm$ 0.018) <sup>a</sup>
C17:1	0.232 ( $\pm$ 0.010) <sup>b***</sup>	0.347 ( $\pm$ 0.009) <sup>a</sup>	0.376 ( $\pm$ 0.015) <sup>a</sup>
C18:0	17.131 ( $\pm$ 0.344) <sup>a</sup>	17.239 ( $\pm$ 0.295) <sup>a</sup>	16.075 ( $\pm$ 0.492) <sup>b*</sup>
c9 C18:1	22.319 ( $\pm$ 0.557) <sup>c***</sup>	30.107 ( $\pm$ 0.476) <sup>b*</sup>	32.362 ( $\pm$ 0.796) <sup>a</sup>
c11 C18:1	1.520 ( $\pm$ 0.121) <sup>b***</sup>	2.126 ( $\pm$ 0.103) <sup>a</sup>	2.0856 ( $\pm$ 0.173) <sup>a</sup>
c12 C18:1	0.721 ( $\pm$ 0.055) <sup>b**</sup>	0.922 ( $\pm$ 0.047) <sup>a</sup>	0.859 ( $\pm$ 0.080) <sup>ab</sup>
c13 C18:1	0.368 ( $\pm$ 0.038) <sup>b**</sup>	0.527 ( $\pm$ 0.033) <sup>a</sup>	0.494 ( $\pm$ 0.055) <sup>a</sup>
c15 C18:1	0.106 ( $\pm$ 0.005) <sup>b*</sup>	0.123 ( $\pm$ 0.004) <sup>a</sup>	0.123 ( $\pm$ 0.007) <sup>a</sup>
t C18:1	2.097 ( $\pm$ 0.064) <sup>a</sup>	1.731 ( $\pm$ 0.055) <sup>b***</sup>	1.680 ( $\pm$ 0.091) <sup>b***</sup>
t16 C18:1	0.387 ( $\pm$ 0.011)	0.408 ( $\pm$ 0.009)	0.385 ( $\pm$ 0.016)
c9, c12 CLA <sup>1</sup>	2.330 ( $\pm$ 0.050)	2.397 ( $\pm$ 0.043)	2.352 ( $\pm$ 0.072)
c9, t11 CLA <sup>1</sup>	0.219 ( $\pm$ 0.011) <sup>b**</sup>	0.256 ( $\pm$ 0.009) <sup>a</sup>	0.274 ( $\pm$ 0.016) <sup>a</sup>
t10, c12 CLA <sup>1</sup>	0.005 ( $\pm$ 0.001) <sup>a</sup>	0.002 ( $\pm$ 0.001) <sup>b†</sup>	0.002 ( $\pm$ 0.002) <sup>a</sup>
n3 C18:3	0.235 ( $\pm$ 0.007)	0.234 ( $\pm$ 0.006)	0.222 ( $\pm$ 0.010)
n6 C18:3	0.017 ( $\pm$ 0.002)	0.015 ( $\pm$ 0.001)	0.015 ( $\pm$ 0.002)
C20:0	0.097 ( $\pm$ 0.004) <sup>a</sup>	0.088 ( $\pm$ 0.003) <sup>b†</sup>	0.080 ( $\pm$ 0.005) <sup>b**</sup>
C20:1	0.059 ( $\pm$ 0.005) <sup>b***</sup>	0.095 ( $\pm$ 0.004) <sup>a</sup>	0.087 ( $\pm$ 0.007) <sup>a</sup>
C20:2	0.012 ( $\pm$ 0.001) <sup>a</sup>	0.010 ( $\pm$ 0.001) <sup>a</sup>	0.006 ( $\pm$ 0.002) <sup>b*</sup>
n3 C20:3	0.008 ( $\pm$ 0.001) <sup>a</sup>	0.004 ( $\pm$ 0.001) <sup>b**</sup>	0.002 ( $\pm$ 0.002) <sup>b**</sup>
n6 C20:3	0.048 ( $\pm$ 0.003) <sup>a</sup>	0.034 ( $\pm$ 0.003) <sup>b***</sup>	0.035 ( $\pm$ 0.004) <sup>b*</sup>

Variable	Healthy	Subclinical ketosis	Clinical ketosis
n6 C20:4	0.135 ( $\pm 0.005$ ) <sup>a</sup>	0.099 ( $\pm 0.004$ ) <sup>b***</sup>	0.098 ( $\pm 0.007$ ) <sup>b***</sup>
n3 C20:5	0.018 ( $\pm 0.001$ )	0.015 ( $\pm 0.001$ )	0.014 ( $\pm 0.002$ )
C21:0	0.013 ( $\pm 0.002$ )	0.011 ( $\pm 0.001$ )	0.010 ( $\pm 0.002$ )
C22:0	0.026 ( $\pm 0.002$ )	0.025 ( $\pm 0.002$ )	0.025 ( $\pm 0.004$ )
n9 C22:1	0.024 ( $\pm 0.003$ ) <sup>b**</sup>	0.035 ( $\pm 0.003$ ) <sup>a</sup>	0.031 ( $\pm 0.005$ ) <sup>ab</sup>
C22:2	0.004 ( $\pm 0.001$ )	0.003 ( $\pm 0.001$ )	0.002 ( $\pm 0.002$ )
C22:5	0.039 ( $\pm 0.003$ ) <sup>a</sup>	0.030 ( $\pm 0.003$ ) <sup>b*</sup>	0.024 ( $\pm 0.005$ ) <sup>b**</sup>
n3 C22:6	0.003 ( $\pm 0.001$ )	0.004 ( $\pm 0.001$ )	0.003 ( $\pm 0.001$ )
C23:0	0.008 ( $\pm 0.001$ )	0.007 ( $\pm 0.001$ )	0.006 ( $\pm 0.001$ )
C24:0	0.016 ( $\pm 0.001$ ) <sup>a</sup>	0.010 ( $\pm 0.001$ ) <sup>b***</sup>	0.008 ( $\pm 0.001$ ) <sup>c***</sup>
C24:1	0.015 ( $\pm 0.002$ )	0.011 ( $\pm 0.002$ )	0.011 ( $\pm 0.003$ )
aC15:0 /C17:0	0.468 ( $\pm 0.014$ ) <sup>a</sup>	0.266 ( $\pm 0.012$ ) <sup>b***</sup>	0.247 ( $\pm 0.020$ ) <sup>b***</sup>
aC15:0/iC17:0	0.828 ( $\pm 0.023$ ) <sup>a</sup>	0.633 ( $\pm 0.019$ ) <sup>b***</sup>	0.576 ( $\pm 0.032$ ) <sup>b***</sup>
c9 C16:1/C15:0	2.388 ( $\pm 0.190$ ) <sup>c***</sup>	4.711 ( $\pm 0.163$ ) <sup>b*</sup>	5.468 ( $\pm 0.272$ ) <sup>a</sup>
C17:0/C15:0	1.043 ( $\pm 0.056$ ) <sup>c***</sup>	1.761 ( $\pm 0.048$ ) <sup>b†</sup>	1.924 ( $\pm 0.080$ ) <sup>a</sup>
c9 C18:1/C14:0	3.046 ( $\pm 0.258$ ) <sup>c***</sup>	6.341 ( $\pm 0.221$ ) <sup>b**</sup>	7.462 ( $\pm 0.369$ ) <sup>a</sup>
c9 C18:1/C15:0	34.256 ( $\pm 2.338$ ) <sup>c***</sup>	66.606 ( $\pm 2.001$ ) <sup>b**</sup>	77.578 ( $\pm 3.342$ ) <sup>a</sup>
SCFA <sup>2</sup>	8.883 ( $\pm 0.198$ ) <sup>a</sup>	5.926 ( $\pm 0.169$ ) <sup>b***</sup>	5.198 ( $\pm 0.283$ ) <sup>c***</sup>
MCFA <sup>3</sup>	41.907 ( $\pm 0.390$ ) <sup>a</sup>	36.064 ( $\pm 0.334$ ) <sup>b***</sup>	35.972 ( $\pm 0.558$ ) <sup>c***</sup>
LCFA <sup>4</sup>	49.220 ( $\pm 0.526$ ) <sup>b***</sup>	58.007 ( $\pm 0.450$ ) <sup>a</sup>	58.829 ( $\pm 0.751$ ) <sup>a</sup>
SFA <sup>5</sup>	67.081 ( $\pm 0.623$ ) <sup>a</sup>	57.950 ( $\pm 0.533$ ) <sup>b***</sup>	55.754 ( $\pm 0.890$ ) <sup>c***</sup>
MUFA <sup>6</sup>	29.895 ( $\pm 0.608$ ) <sup>c***</sup>	38.966 ( $\pm 0.520$ ) <sup>b*</sup>	41.214 ( $\pm 0.869$ ) <sup>a</sup>
PUFA <sup>7</sup>	3.030 ( $\pm 0.059$ )	3.077 ( $\pm 0.051$ )	3.029 ( $\pm 0.085$ )

<sup>1</sup>Conjugated linoleic acid; <sup>2</sup>Short chain fatty acids (C4 to C10); <sup>3</sup>Medium chain fatty acids (C11 to C16); <sup>4</sup>Long chain fatty acids (C17 or more); <sup>5</sup>Saturated fatty acids; <sup>6</sup>Monounsaturated fatty acids; <sup>7</sup>Polyunsaturated fatty acids;

a – anteiso; i – iso; c – cis; t – trans;

<sup>a, b</sup>Means in same row with different letters are statistically different.

† $P < 0.10$ ; \* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ ; \*\*\* $P < 0.001$ .

**Table 6.** Area under the ROC curve of fatty acids (g/100g of fat) and ratios to identify ketosis in early lactation.

Fatty acid or ratio	AUC <sup>1</sup>	CI 95% <sup>2</sup>	AC <sup>3</sup>	Se <sup>4</sup>	Sp <sup>5</sup>
C13:0	0.94 (±0.02)***	0.89 to 0.96	≤0.049	91.13	92.42
<i>c9</i> C18:1/C14:0	0.93 (±0.02)***	0.88 to 0.96	>4.280	90.32	89.39
LCFA <sup>6</sup>	0.93 (±0.02)***	0.88 to 0.96	>53.045	95.16	80.30
C12:0	0.93 (±0.02)***	0.88 to 0.96	≤1.481	88.71	87.88
<i>c9</i> C18:1/C15:0	0.92 (±0.02)***	0.87 to 0.95	>49.054	83.06	87.88
C10:0	0.92 (±0.02)***	0.87 to 0.95	≤1.557	93.55	81.82
<i>c9</i> C16:1/C15:0	0.92 (±0.02)***	0.87 to 0.95	>2.839	92.74	83.33
C14:0	0.91 (±0.02)***	0.86 to 0.95	≤6.663	95.16	80.30
C17:0/C15:0	0.91 (±0.02)***	0.86 to 0.95	>1.300	88.71	84.85
C10:1	0.91 (±0.02)***	0.86 to 0.95	≤0.072	90.32	83.33
MUFA <sup>7</sup>	0.91 (±0.02)***	0.86 to 0.95	>35.518	83.06	87.88
C15:0	0.91 (±0.02)***	0.86 to 0.95	≤0.638	95.97	74.24
MCFA <sup>8</sup>	0.91 (±0.02)***	0.86 to 0.95	≤38.652	93.55	77.27
SFA <sup>9</sup>	0.91 (±0.02)***	0.86 to 0.95	≤63.083	91.13	80.30
C8:0	0.91 (±0.02)***	0.86 to 0.95	≤0.855	91.60	80.30
SCFA <sup>10</sup>	0.90 (±0.02)***	0.85 to 0.94	≤7.497	85.48	84.85
aC15:0/C17:0	0.90 (±0.03)***	0.85 to 0.94	≤0.375	95.16	78.79
<i>c9</i> C18:1	0.90 (±0.02)***	0.85 to 0.94	>27.350	81.45	90.91
C6:0	0.90 (±0.02)***	0.85 to 0.94	≤1.677	91.13	77.27

<sup>1</sup>Area under curve for the positive outcome ( $\beta$ -hydroxybutyrate  $\geq$  1.200mmol/L);

<sup>2</sup>Confidence interval at 95% probability; <sup>3</sup>Associated criterion; <sup>4</sup>Sensitivity; <sup>5</sup>Specificity;

<sup>6</sup>Long chain fatty acids (C17 or more); <sup>7</sup>Monounsaturated fatty acids; <sup>8</sup>Medium chain fatty acids (C11 to C16); <sup>9</sup>Saturated fatty acids; <sup>10</sup>Short chain fatty acids (C4 to C10).

a – anteiso; i – iso; c – cis.

\*\*\* $P < 0.001$ .

**Table 7.** Risk factors of low cumulative milk production in first 100 DIM (adjusted according parity order), according fatty acids classes in early lactation cows.

	Estimate	SE	Odds ratio	95% CI	P-value
<b>C17:0/C15:0 ratio</b>					
< 0.939	0.5501	0.7189	1.733	0.424 to 7.093	0.4442
≥ 0.939 and ≤ 2.109			<i>Referent</i>		
> 2.109	1.7804	0.7135	5.932	1.465 to 24.020	0.0126
<b>cis-9 C18:1/C14:0 ratio</b>					
< 2.614	-0.0204	0.7751	0.980	0.214 to 4.476	0.9790
≥ 2.614 and ≤ 8.016			<i>Referent</i>		
> 8.016	-2.1833	0.8777	0.113	0.020 to 0.629	0.0129
<b>SCFA<sup>1</sup> (g/100g)</b>					
< 4.763	1.5910	0.6342	4.908	1.416 to 17.014	0.0121
≥ 4.763 and ≤ 9.121			<i>Referent</i>		
> 9.121	0.2893	0.5188	1.336	0.483 to 3.692	0.5771

<sup>1</sup>Short chain fatty acids (C4 to C10).

**Table 8.** Risk factors of low daily milk production average in first 100 DIM (adjusted according parity order), according fatty acids classes in early lactation cows.

	Estimate	SE	Odds ratio	95% CI	P-value
<b>C18:1 <i>cis</i>-9 / C15:0 ratio</b>					
< 30.442	1.6267	0.7256	5.087	1.227 to 21.090	0.0250
≥ 30.442 and ≤ 82.260			<i>Referent</i>		
> 82.260	0.9315	0.6158	2.538	0.759 to 8.486	0.1304
<b>C18:1 <i>cis</i>-9 / C14:0 ratio</b>					
< 2.614	1.7394	1.1732	5.694	0.571 to 56.767	0.1382
≥ 2.614 and ≤ 8.016			<i>Referent</i>		
> 8.016	-1.7504	0.7880	0.174	0.037 to 0.814	0.0263
<b>LCFA<sup>1</sup> (g/100g)</b>					
< 48.823	-2.7999	1.1893	0.061	0.006 to 0.626	0.0186
≥ 48.823 and ≤ 60.975			<i>Referent</i>		
> 60.975	0.9877	0.6127	2.685	0.808 to 8.923	0.1069
<b>PUFA<sup>2</sup> (g/100g)</b>					
< 2.557	0.9943	0.4772	2.703	1.061 to 6.887	0.0372
≥ 2.557 and ≤ 3.515			<i>Referent</i>		
> 3.515	1.0055	0.4377	2.733	1.159 to 6.445	0.0216

<sup>1</sup>Long chain fatty acids (C17 or more); <sup>2</sup>Polyunsaturated fatty acids.

**Table 9.** Risk factors associate with reproductive failure at 150 DIM, according fatty acids classes in early lactation cows.

Variable	Estimate	SE	Odds ratio	95% CI	P-value
<b>C18:1 <i>cis</i>-9 (g/100g)</b>					
< 21.529	-0.4746	0.9370	0.622	0.099 to 3.903	0.6125
≥ 21.529 and ≤ 33.607			<i>Referent</i>		
> 33.607	2.5943	0.9198	13.387	2.207 to 81.203	0.0048
<b>C17:0 / C15:0 ratio</b>					
< 0.939	0.2559	1.0163	1.292	0.176 to 9.467	0.8012
≥ 0.939 and ≤ 2.109			<i>Referent</i>		
> 2.109	-1.8339	0.6539	0.160	0.044 to 0.576	0.0050
<b>LCFA<sup>1</sup> (g/100g)</b>					
< 48.823	2.1058	1.2615	8.214	0.693 to 97.340	0.0951
≥ 48.823 and ≤ 60.975			<i>Referent</i>		
> 60.975	-1.1536	0.6251	0.316	0.093 to 1.074	0.0650

<sup>1</sup>Long chain fatty acids (C17 or more).



**Table 10.** Area under the ROC curve of fatty acids (g/100g of fat) and ratios to identify culling or death until 60 DIM.

	AUC <sup>1</sup>	CI <sup>2</sup> 95%	AC <sup>3</sup>	Se <sup>4</sup>	Sp <sup>5</sup>
C17:0/C15:0	0.91 (±0.03) ***	0.87 to 0.95	>1.898	100	79.23
aC15:0/C17:0	0.90 (±0.04) ***	0.85 to 0.94	≤0.201	85.71	86.34
aC15:0	0.89 (±0.03) ***	0.84 to 0.93	≤0.180	100	80.33
aC15:0/iC17:0	0.88 (±0.04) ***	0.83 to 0.93	≤0.504	85.71	84.70
C15:0	0.88 (±0.03) ***	0.83 to 0.92	≤0.418	100	82.51
iC14:0	0.86 (±0.05) ***	0.80 to 0.90	≤0.056	100	67.21
iC15:0	0.85 (±0.06) ***	0.79 to 0.90	≤0.123	85.71	76.5
c9 C18:1/C15:0	0.84 (±0.06) ***	0.78 to 0.89	>76.242	85.71	83.61
iC16:0	0.82 (±0.07) ***	0.76 to 0.88	≤0.168	71.43	84.62
C14:0	0.82 (±0.06) ***	0.76 to 0.87	≤5.463	100	57.92
c9 C18:1/C14:0	0.81 (±0.06) ***	0.75 to 0.87	>5.603	100	60.11
C6:0	0.81 (±0.06) ***	0.75 to 0.87	≤1.029	85.71	73.77
C11:0	0.81 (±0.05) ***	0.75 to 0.86	≤0.009	100	64.29
C10:0	0.81 (±0.07) ***	0.74 to 0.86	≤1.119	100	54.64

<sup>1</sup>Area under curve for the positive outcome (culling or death until 60 DIM); <sup>2</sup>Confidence interval at 95% probability; <sup>3</sup>Associated criterion; <sup>4</sup>Sensitivity; <sup>5</sup>Specificity.

a – anteiso; i – iso; c – cis.

\*\*\*P < 0.001